Année scolaire
1973-1974
N° d'ordre : 3

THESES

présentées
A L'UNIVERSITE DE BORDEAUX II
Unité d'Enseignement et de Recherches des Sciences pharmaceutiques

pour
LE DOCTORAT D'ETAT EN PHARMACIE

par

Nicole VRIGNAUD née DUFRECHE
Pharmacien
Assistante au Laboratoire de Physique Pharmaceutique
C.E.S. : Sérologie – Hématologie
C.E.S. de contrôle Physico-Chimique des Médicaments
C.E.S. d'Application à la Pharmacie des Radio-éléments (Saclay)
C.E.S. d'Hydrologie et Climatologie

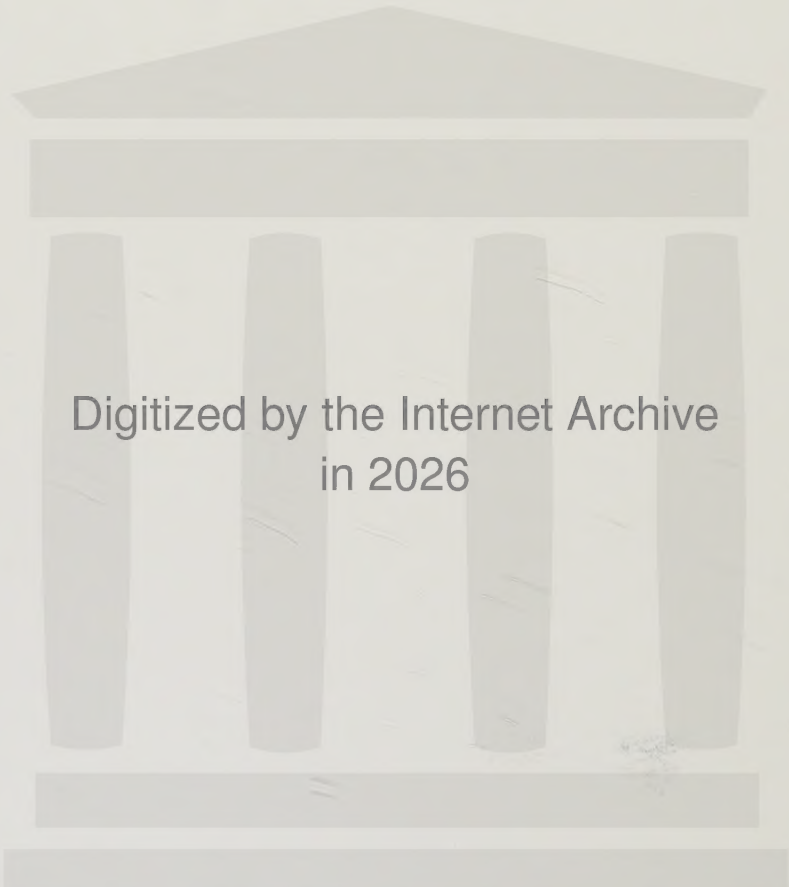
1ere Thèse : Méthodes de dosage du cuivre utilisant le Radiocuivre 64 applicables aux milieux biologiques

2e Thèse : Radioisotopes et Toxicologie

Présentées et Soutenues publiquement le 5 juin 1974
devant la Commission d'Examen

MM. P. BLANQUET Professeur ..... Président
P. MESNARD Professeur ..... } Juges
R. CROCKETT Professeur ..... }

Editions Bergeret, 71-73, rue Leyteire – BORDEAUX – Tél. (56) 91.12.59


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547319_0022

Année scolaire
1973-1974
N° d'ordre : 3

THESES

présentées
A L'UNIVERSITE DE BORDEAUX II
Unité d'Enseignement et de Recherches des Sciences pharmaceutiques

pour
LE DOCTORAT D'ETAT EN PHARMACIE

par

Nicole VRIGNAUD née DUFRECHE
Pharmacien
Assistante au Laboratoire de Physique Pharmaceutique
C.E.S. : Sérologie – Hématologie
C.E.S. de contrôle Physico-Chimique des Médicaments
C.E.S. d'Application à la Pharmacie des Radio-éléments (Saclay)
C.E.S. d'Hydrologie et Climatologie

1ere Thèse : Méthodes de dosage du cuivre utilisant le Radiocuivre 64 applicables aux milieux biologiques

2e Thèse : Radioisotopes et Toxicologie

Présentées et Soutenues publiquement le 5 juin 1974
devant la Commission d'Examen

MM. P. BLANQUET Professeur ..... Président
P. MESNARD Professeur ..... } Juges
R. CROCKETT Professeur ..... }

Editions Bergeret, 71-73, rue Leyteire – BORDEAUX – Tél. (56) 91.12.59

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A NOS JUGES

Monsieur le Professeur R. CROCKETT

Professeur titulaire à titre personnel
de Biochimie pharmaceutique
Licencié ès Sciences
Ancien interne en pharmacie des Hôpitaux de Bordeaux
Médaille d'Or de l'internat
Ancien Assistant des Hôpitaux
Chevalier des Palmes académiques

L'intérêt que vous avez toujours porté à la recherche scientifique, vos vastes connaissances en chimie biologique, l'amitié que vous nous avez constamment manifestée, nous a conduit à vous, pour vous demander de juger ce travail.
Veuillez trouver ici, l'expression de notre très amicale et très respectueuse reconnaissance.

Monsieur le Professeur P. MESNARD

Professeur de Chimie organique et Chimie analytique
Membre correspondant de l'Académie de Pharmacie
Docteur ès Sciences physiques
Inspecteur principal des Pharmacies
Chevalier de la Légion d'Honneur
Officier de l'Ordre national du Mérite
Officier des Palmes académiques
Officier de la Santé publique
Médaille de Vermeil du Service de Santé de la Marine
Membre correspondant de la Réal Académia de Farmacia
de Madrid
Membre d'Honneur de la Société de Pharmacie
de Bénarès (Inde)

C'est un très grand honneur pour nous, que vous ayiez accepté de juger cette thèse.
Par votre haute valeur scientifique, par la qualité de votre enseignement, vous êtes pour nous un exemple.
Veuillez trouver ici l'expression de notre admiration et de notre profond respect.

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur P. BLANQUET

Professeur de Physique nucléaire appliquée
et de Radiobiologie
Pharmacien
Biologiste des Hôpitaux
Docteur ès Sciences physiques
Chevalier de la Légion d'Honneur
Officier des Palmes académiques
Médaille de Vermeil du Service de Santé de la Marine
Visiting Professor de l'Université de Californie
Berkeley - U.S.A.

Vous nous avez initiée à l'utilisation des Radioéléments. Comme tous ceux qui ont eu le privilège de travailler sous votre direction, nous avons pu apprécier l'étendue de vos connaissances, et découvrir sous votre conduite bienveillante, les apports enrichissants du travail d'équipe.
Vous nous faites aujourd'hui le très grand honneur de présider ce jury ; que cette thèse soit l'expression de notre profonde gratitude et de notre indéfectible attachement.

MÉTHODES DE DOSAGE DU CUIVRE UTILISANT LE RADIOCUIVRE 64 APPLICABLES AUX MILIEUX BIOLOGIQUES

*

P L A N

I N T R O D U C T I O N .

Chapitre I : LE CUIVRE. ETUDE BIOLOGIQUE

Introduction
Besoins en cuivre
Métabolisme du cuivre
Le cuivre dans les organes
Le cuivre dans le sang
Variations du cuivre sanguin
Rôle du cuivre dans l'organisme
Conclusion

Chapitre II : RAPPEL DES METHODES DE DOSAGE DU CUIVRE DANS LES MILIEUX BIOLOGIQUES ET EN PARTICULIER LE SERUM

Méthodes de dosage colorimétriques
Méthodes de dosage par polarographie
Méthodes de dosage par spectrophotométrie de flamme par émission
Méthodes de dosage par spectrophotométrie d'absorption atomique
Méthodes de dosage par radioactivation
Méthodes de dosage par dilution radioisotopique
Conclusions

Chapitre III : RAPPEL SUR LES ISOTOPES RADIOACTIFS DU CUIVRE

Chapitre IV : DOSAGE DU CUIVRE SERIQUE A L'AIDE DE LA METHODE PAR DILUTION RADIO-ISOTOPIQUE

Rappel théorique de la méthode par dilution radio-isotopique

Mise au point de la méthode sur des solutions minérales aqueuses de cuivre
Application au dosage du cuivre sérique

Chapitre V : DOSAGE DU CUIVRE SERIQUE PAR FIXATION COMPETITIVE SUR UNE PROTEINE

Introduction
Rappel théorique sommaire sur les réactions de compétition
Essais préliminaires
Préparation de l'apocœruloplasmine
Etude de la réaction de compétition elle-même
Discussion
Conclusion

C O N C L U S I O N S

B I B L I O G R A P H I E

I N T R O D U Ç T I O N

Dans ce travail, deux méthodes de dosage du cuivre, utilisant le cuivre radioactif Cu64 comme marqueur, et applicables aux milieux biologiques et en particulier au sérum, sont étudiées. La première, utilise la dilution radioisotopique, la seconde, les techniques basées sur l'emploi d'un agent liant spécifique.

Avant de décrire ces méthodes, une rapide étude sur la biologie du cuivre est faite. Elle est suivie d'un rappel des différentes méthodes de dosage de cet élément : colorimétrie, polarographie, spectroscopie d'émission, absorption atomique, radioactivation et dilution radioisotopique.

La première méthode de dosage décrite, fait appel à une variante de la méthode classique de dosage par dilution radioisotopique : la dilution radio-isotopique avec extraction incomplète qui permet de remplacer les mesures de radioactivité spécifique, par de simples mesures de radioactivité. Le cuivre est extrait sous forme de dithizonate au pH 2,3. A ce pH en effet, l'extraction du cuivre est difficile mais spécifique. Les différents facteurs intervenant dans la réaction ont été étudiés, ainsi que la spécificité vis-à-vis du fer et du zinc. La sensibilité de la méthode est de 0,02 µg dans la prise d'essai. Les résultats obtenus dans des dosages de cuivre sérique ont été comparés avec ceux obtenus par la méthode colorimétrique à l'oxalyldihydrazide et par l'absorption atomique. La concordance est bonne.

Une deuxième méthode plus originale a ensuite été mise au point . Elle utilise une réaction de compétition entre l'apocoeruloplasmine et le cuivre, en présence de Cu64. Une étude sur la préparation de l'apocoeruloplasmine a d'abord été entreprise et c'est finalement l'action des cyanures sur la coeruloplasmine, qui a été retenue. Ensuite, les différents paramètres intervenant dans la réaction de compétion elle-même ont été édudiés et principalement, le pH et les concentrations relatives protéine proteuse - cuivre à doser - cuivre radioactif, car ils ont une grande influence sur la sensibilité de la réaction. Celle-ci peut atteindre le 1/1000 de ug de cuivre.

Ces deux méthodes de dosage, sont intéressantes par leurs qualités de spécificité et de sensibilité qui sont supérieures à celles des méthodes classiques. La sensibilité de la deuxième méthode surtout est tout à fait comparable à celle de l'absorption atomique.

C H A P I T R E I

LE CUIVRE
ETUDE BIOLOGIQUE

INTRODUCTION

Les composés du cuivre ont été utilisés en médecine depuis la plus haute antiquité. HIPPOCRATE et PARACELSE les recommandaient dans le traitement des maladies mentales ou des affections pulmonaires. Leur usage, en faveur jusqu'au 18è siècle connut un déclin au 19è siècle. En 1875, cependant une étude de PORTER prouva que le cuivre était un constituant normal du sang (113). Mais la véritable importance de cet élément ne fut pas reconnue avant 1924, quand HART, STEEBOCK, ELVEHJEM et coll (41) démontrèrent que des lapins et des rats maintenus à un régime uniquement lacté,souffraient d'une anémie guérie non par du fer, mais par du cuivre. Après cette découverte, les cliniciens, et plus spécialement les pédiatres et les hématologistes, s'intéressèrent à nouveau au cuivre. Des rapports sur la valeur de cet élément dans le traitement de l'anémie hypochrome apparurent alors (21).

Actuellement le rôle du cuivre chez l'homme se précise chaque jour. Il fait partie des oligoéléments essentiels, (comme le fer, le cobalt, le manganèse, le zinc et le molybdène) et doit être considéré comme indispensable au développement de la plupart des espèces.

La carence en cuivre chez l'animal, provoque une anémie , des lésions au niveau du myocarde, du système nerveux, du tissu osseux, de la peau et de l'intestin (68,87).

Des recherches très poussées, ont permis d'isoler les différents enzymes cupriques : tyrosinase, butyryl COA déshydrogénase etc... actifs seulement en présence de cuivre.

BESOINS EN CUIVRE

Les besoins quotidiens sont au minimum de 80 µg par kg chez l'enfant et de 30 µg par kg chez l'adulte (115).

L'administration moyenne de cuivre serait de 2 à 3 mg par jour.

La teneur en cuivre des aliments varie considérablement, elle dépend de la richesse en cuivre du sol d'où proviennent ces aliments.

Des études (84) ont mis en évidence la richesse en cuivre de certains aliments protéiques (foie, rognon, coeur et cervelle) et de quelques crustacés, les huitres en particulier, ainsi que des noix, des fruits à noyaux etdu cacao. Les aliments les plus pauvres en cuivre sont (1) : le lait, les produits laitiers, le lard, la margarine .

Signalons le parallélisme entre les aliments riches en fer et en cuivre, à l'exception des crustacés et des poissons, nettement plus riches en cuivre.

METABOLISME DU CUIVRE

1) Absorption :

Si de nombreux travaux portent sur l'absorption du fer, beaucoup moins concernent le cuivre (15,37,49).

Quelques études ont été faites sur des animaux (36,51,120) SACKS, LEVINE, HILL et HUGUES (120) ont mis en évidence chez le chien, l'absorption haute du cuivre

dans le jéjunum, c'est-à-dire, dans la partie intestinale à pH bas. Elle dépend donc de l'acidité du suc gastrique et de la présence de certaines subtances alimentaires, du calcium enparticulier. DICK (36) met en évidence l'influence de l'alimentation sur l'assimilation et l'excrétion du cuivre : l'addition de quantités importantes de $CaCO_3$ et de $FeSO_4$ diminue l'absorption par modification du pH intestinal, phénomène non observé lors de l'utilisation de composés non basiques.

Très peu d'études ont été effectuées sur l'absorption du cuivre chez l'homme. On ne sait sous quelle forme le cuivre est le plus facilement absorbé VAN RAVESTEYN (140) ayant administré, par voie orale, 200 mg de sulfate de cuivre chez trois sujets normaux n'a pas observé de pic au niveau du plasma. Il en a conclu que le cuivre se dépose dans le foie. SCHUBERT et RIEZLER (128) utilisant du cuivre radioactif, ont pu détecté dans le sang, après administration orale, seulement de petites quantités de cet élément. Cependant, des études analogues effectuées sur des animaux, avaient montré que si le cuivre était administré en grandes quantités, on retrouvait un pic considérable au niveau du plasma (22).

Plus récemment, WEBER, a parfait la connaissance de l'absorption gastro-intestinale du cuivre, à l'aide du Cu64 et de la caméra à scintillation (145).

2) *Excrétion*

Le cuivre s'élimine par les urines et surtout par les fécés (140). Après trois injections d'une quantité totale de 33 mg de cuivre, l'excrétion de cet élément dans les selles augmente de 2,5 mg par jour, pendant les quelques semaines où la plupart du cuivre administré est éliminé (140) . L'élimination totale est plus prononcée, lorsque le cuivre est administré per os, que lors d'injections intraveineuses : respectivement 78 % dans les six premiers jours, contre 6 % seulement .D'où , plus longue efficacité thérapeutique du cuivre injecté.

La teneur normale en cuivre des urines a été déterminée par différents auteurs, les résultats sont présentés dans le tableau I :

TABLEAU I

Excrétion du cuivre par les urines chez des sujets normaux .

A U T E U R S	*Nombre de sujets*	*Prise en cuivre en mg/24h*	*Cuivre urinaire en mg/24 h (moyenne)*
CHOU et ADOLPH (27)	4	2,31	0,26
VAN RAVESTEYN (140)	4	---	0,03
LEVERTON (83)	24	2,50	0,20

L'excrétion normale du cuivre par les reins chez les adultes est de 0,25 mg/24 Heures. Elle est moindre chez les enfants. Il n'y a pas, apparemment, de corrélation entre la totalité de cuivre ingérée et la totalité excrétée dans les urines. Les reins ne constituent , par conséquent, pas une voie d'excrétion importante pour le cuivre.

Une quantité insignifiante de cuivre est perdue dans la sueur. MITCHELL et HAMILTON (99) ont trouvé que la sueur contenait environ 5,8 µg de cuivre pour 100 ml.

Au cours des pertes menstruelles, une petite quantité de cuivre est également éliminée. LEVERTON et BINKLEY (83) ont trouvé que la perte moyenne par jour chez quatre sujets a été :

0,32 mg
0,48 mg
0,65 mg
0,74 mg
moyenne : 0,55 mg pour tous les sujets.

Au cours de la lactation, la perte cuprique est de l'ordre de 0,40 mg par jour.

LE CUIVRE DANS LES ORGANES

Le corps humain renferme entre 100 et 150 mg de cuivre (20,27,55,73,121,135).

CUNNINGHAM (31) indique, pour quelques organes, les chiffres moyens suivants chez l'adulte (exprimés en p.p.m. de poids sec). :

TABLEAU II

Répartition du cuivre dans les organes

Foie	*Reins*	*Cerveau*	*Rate*	*Pancréas*
24,9	17,5	17,5	5,2	4,3

La concentration du cuivre dans le foie est supérieure à celle des autres organes. La concentration en cuivre du foie du foetus est 5 à 10 fois supérieure à celle du foie de l'adulte. Durant la vie foetale, la concentration en cuivre du foie augmente jusqu'à un maximum au 9è mois ; cette concentration décroit ensuite régulièrement pendant la première année de vie, mais à un an,

elle est encore supérieure à celle du foie de l'adulte (2). Entre 1 et 5 ans, elle reste élevée, et ce n'est qu'entre 5 et 15 ans que les valeurs de la teneur en cuivre du foie deviennent identiques à celles de l'adulte (2).

La concentration du cuivre dans le foie diminue au cours de l'anémie nutritionnelle (27) et augmente au cours de l'anémie méditerranéenne (122), de la cirrhose du foie (89), de la tuberculose (18) et des maladies chroniques accompagnées d'anémie (122).

Des dépots de cuivre dans les organes, se rencontrent chez les sujets atteints de maladies malignes.

LE CUIVRE DANS LE SANG

Les nombreux dosages du cuivre sur le sérum humain donnent un taux moyen de 1,15 mg/litre $\pm$ 4 %.

Dans le sang total, ce taux est légèrement abaissé, il est d'environ 1,05 mg/l ; chez la femme, il est légèrement supérieur de 2 à 3 % .

Les valeurs trouvées par différents auteurs sont résumées dans le tableau suivant :

TABLEAU III

Valeurs normales du cuivre du sang total,

AUTEURS	Sexe	Nombre de sujets	Moyenne µg %
SACHS et coll (120)	Hommes Femmes	10 10	102 107
LAHEY et coll (81)	Hommes Femmes	12 11	91 96
HOLMBERG (64)	Femmes	22	97
HEILMEYER et coll (62)	Hommes et Femmes	8	110

Peu de dosages de cuivre sanguin ont été effectués chez les enfants. Citons cependant les travaux d'AXTRUP (2), ceux de CASTELLO (23), et ceux de POGGINI (111). La teneur en cuivre du plasma des foetus de 5 à 6 mois est élevée : entre 195 et 235 µg % ; le plasma des nouveau-nés est pauvre : 53 à 83 µg de cuivre % ; au cours des dix premiers jours de la vie, le cuivre du plasma et des globules rouges augmente, et à la deuxième semaine, les valeurs atteignent celles des adultes.

Le cuivre est distribué approximativement de façon égale entre les cellules et le plasma. La teneur en cuivre des leucocytes et des plaquettes est considérablement inférieure à celle des hématies, à peu près le quart. CARWRIGHT (22) donne le tableau suivant :

TABLEAU IV

Répartition du cuivre sanguin entre le plasma et les cellules (en mg par litre)

Sexe	*Sang total*	*Plasma*	*Cellules*
Homme	0,89 - 0,93	0,100 - 0,110	0,74 - 0,79
Femme	0,93 - 0,100	0,100 - 0,119	0,70 - 0,79

Dans les hématies, le cuivre est combiné à une protéine : *l'hémocupréine (90)* de PM 35 000 qui contient 0,34 % de cuivre.

Dans le sérum, 90 % du cuivre est inclus dans la *coeruloplasmine*, protéine du groupe des α_2 globulines, de PM environ 151 000 . Une molécule de coeruloplasmine contient 8 atomes de cuivre (56,86,92,98,114,130,141,143).

Cette protéine dont la présence fut soupçonnée dès 1940, fut isolée par HOLMBERG et LAURELL (64,65). Ces auteurs ont décrit des méthodes de préparation de la coeruloplasmine pure et ont reconnu que presque tout le cuivre du plasma des mammifères était contenu dans cette protéine . Cette protéine est d'une couleur bleue qui peut disparaitre sous l'action d'agents réducteurs forts; l'activité oxydante du plasma, vis-à-vis des polyphénols et des polyamines, en particulier, est due à la coeruloplasmine.

La relation entre cette protéine et l'hémocupréine, n'est pas entièrement éclaircie. Cependant, puisque l'hémocupréine contient 2 atomes de cuivre, HOLMBERG et LAURELL ont suggéré que leur protéine pouvait renfermer 4 hémocupréines.

La fonction de cette protéine, n'est pas connue. Il semble improbable que ce composé serve au transport du cuivre absorbé, à l'inverse de la β_1 globuline qui transporte le fer. En effet, dans les circonstances normales, elle est entièrement liée au cuivre et n'a pas la propriété de se surcharger en cuivre ou de libérer ce cation, alors que le fer de la sidérophiline est presque totalement libérable : 1/3 seulement restant fixé à la protéine (22).

On peut penser que le cuivre transportable ne représente qu'une quantité négligeable du cuivre plasmatique, et que ce cuivre durant son transport est lié d'une manière lâche aux autres protéines. On sait, par exemple, que les albumines sont capables de fixer d'une façon lâche, le cuivre, in vitro.

COHN (28) a montré de plus, que la protéine liée au fer : la β_1 globuline, est capable d'union réversible avec le cuivre . Quoique cette protéine, s'unisse de préférence au fer, et que l'addition de cuivre au sérum, n'affecte pas cette capacité d'union avec le fer, il est encore possible que cette protéine transporte également du cuivre.

VARIATIONS DU CUIVRE SANGUIN

Le taux de cuivre semble se maintenir constant d'un jour à l'autre. Il ne semble pas non plus y avoir de variation importante de la cuprémie après les repas, le jeûne, ou , en général après l'effort bien que HARALCAMBIE et LAHEY (60,81) signalent des taux de cuivre variables suivant le mouvement rythmique quotidien.

Les variations les plus nettes résultent :

- du régime
- de la maladie
- et aussi d'un état physiologique : la gestation.

1) Variations avec le régime

Des régimes déficients en cuivre s'accompagnent d'hypocuprémie. Des expériences ont été réalisées dans ce sens sur des animaux, (81).

Il existe un antagonisme : cuivre-molybdène.

L'addition de molybdène à la ration d'animaux paissant sur des pâturages riches en cuivre provoque une hypocuprémie (13). Cependant le molybdène ne diminue pas la cuprémie, si le régime contient une quantité suffisante de soufre minéral.

2) Variations avec la maladie

- Maladies infectieuses

Le taux de cuivre sanguin augmente au cours des maladies infectieuses, aigues ou chroniques. Ceci a été vérifié par de nombreux auteurs (21,62,74,96). Toute infection, s'accompagne toujours, au moins dans la phase initiale, d'une hypercuprémie contrastant avec une hyposidérémie. Le cuivre semble mobilisé, prenant la place du fer dans le sang. Un simple corysa fébrile cause une hypercuprémie importante .

Le cuivre semble participer à la formation des anticorps peut-être par excitation du système réticulo-endothélial. HEILMEYER (62) stimulant ce système par

l'argent colloïdal, le bleu trypan ou la tyroxine, mobilise le cuivre hépatique ou splénique.

Donc, dans les infections, si le fer sérique diminue, par défaut d'absorption et par fuite vers les tissus, la cuprémie augmente et cette hypercuprémie peut être considérée comme une réaction de défense spécifique de l'organisme. Les variations importantes du taux de cuivre peuvent être rapportées au déséquilibre du système neuro-végétatif (123). Voici à titre d'exemple, un tableau des taux de la cuprémie et de la sidérémie dans différents états infectieux chez l'enfant (TURPIN et coll.) (138).

TABLEAU V

Taux de la cuprémie et de la sidérémie au cours de maladies infectieuses (en µg %)

	Cuprémie en µg %	*Sidérémie en µg %*
Etat normal	105	
Primo-infection tuberculeuse	166	66
Nodules tuberculeux	188	58
Méningite tuberculeuse	177	68
Tuberculose pulmonaire bilatérale	185	198
Rhumatisme articulaire aigu.	152	94
Fièvre typhoïde	172	75

- Leucémies

Au cours des leucémies aigues, des valeurs extrêmement élevées du taux du cuivre sanguin, plasmatique comme cellulaire, ont été observées (2,62,91) .

Au cours des leucémies chroniques le taux du cuivre sanguin augmente légèrement.

- Tumeurs malignes

Une augmentation du cuivre sanguin a été observée chez des patients atteints, de différents types de tumeurs malignes. Le cuivre des hématies décroit alors souvent et il en résulte une diminution du rapport cuivre cellulaire / cuivre plasmatique (62, 66).

Chez des patients atteints de maladie de Hodgkins, CARTWRIGHT (22) a observé une augmentation du cuivre sanguin et plasmatique, sans changement du cuivre cellulaire, d'où diminution encore du rapport cuivre cellulaire / cuivre plasmatique.

- Anémies

Au cours de l'anémie ferriprive, il y a une augmentation nette du cuivre du sang total et du plasma. Il en résulte donc une augmentation du rapport cuivre cellulaire / cuivre plasmatique (62).

Au cours de l'anémie nutritionnelle des enfants, AXTRUP (2) a trouvé des valeurs normales pour les taux du cuivre du sang total et du plasma.

Au cours de l'anémie pernicieuse, CARTWRIGHT (22) a observé une légère mais proportionnelle augmentation du cuivre dans le sang total, le plasma et les cellules. Le taux du cuivre des macrocytes, est, cependant, très augmenté.

Au cours de l'anémie aplastique, le taux du cuivre plasmatique augmente.

- Maladies diverses

Le dosage de la cuprémie est très important pour le diagnostic de la dégénérescence hépato-lenticulaire *(maladie de Wilson)*. Au cours de cette maladie, les perturbations atteignent surtout les acides aminés et le cuivre. La cuprémie est élevée, de même que l'élimination urinaire du cuivre et des acides aminés (26, 43, 54, 108). Cette dernière perte pourrait être à l'origine de la cirrhose du foie. Plusieurs auteurs, et notamment HAUROWITZ (61), GLAZEBROOK (53), puis CUMMINGS (30) ont également mis en évidence un taux de cuivre anormal dans le foie et les noyaux gris centraux. D'ailleurs, l'étude de fragments de tissus hépatiques a montré l'augmentation de l'avidité pour le cuivre, avidité due à la présence d'une fraction supplémentaire. Puis, le cuivre se déposerait parsuite d'un développement du métabolisme des protides qui donnerait des protéines très avides de cuivre et augmenterait l'absorption intestinale (139). Certains auteurs ayant pourtant trouvé des taux de cuprémie normaux, TURPIN et ses collaborateurs, supposent que la maladie de Wilson présenterait successivement :
- un trouble du métabolisme des acides aminés, puis une cirrhose et ensuite une intoxication progressive par le cuivre.

Cette maladie se caractériserait aussi par une carence en coeruloplasmine, ce qui expliquerait son caractère familial. Il y aurait donc hypercuprémie et défaut de coerulo-plasmine, peut-être dû à une déficience de synthèse de la protéine cuprique. Le cuivre existerait alors sous une forme anormale dans le plasma (95). Dans le sérum, le cuivre, au lieu de se fixer comme normalement sur l'albumine et les α globulines, se localiserait presque uniquement sur l'albumine (5). Les agents complexant le cuivre (B.A.L et maintenant D.pénicillamine) augmenteraient son élimination, donnant de très bons résultats (144).

La cuprémie varie aussi au cours des *affections thyroïdiennes* (50,70).

- Un hyperfonctionnement s'accompagne d'hypercuprémie

- un hypofonctionnement s'accompagne d'hypocuprémie. Des dosages , au cours de diverses endocrinopathies infantiles donnent (138) :

  - myxoedème congénital : 0,55 mg %
  - adiposité hypothyroïdienne : 0,76 %
  - myxoedème d'origine diencéphalo-hypophysaire : 0,58 mg %
  - maladie de Basedow : 1,76 %

D'après HEILMEYER (62) une relation étroite existe entre le taux de cuivre et le métabolisme de base .

Enfin, l'étude du rapport fer sérique/cuivre sérique permet le diagnostic différentiel des *ictères* ce rapport est supérieur à 1 dans l'ictère par hépatite et inférieur à 1 dans l'ictère par obstruction.

3) Variations au cours de la grossesse

Une augmentation du cuivre plasmatique, au cours de la grossesse a été observée par différents auteurs (14,19,47,58,62,127) . Durant la grossesse, le cuivre plasmatique atteint en effet le taux de 261 $\pm$ 10 µg % . Il commence à augmenter au cours du premier trimestre et atteint sa valeur maximale au cours du dernier trimestre. THOMPSON et WATSON confirment ces résultats, notant d'autre-part, une élévation significative du cuivre dans la pré-éclampsie (134). La cuprémie, se normalise ensuite, quelques semaines après l'accouchement.

Le taux du cuivre sanguin, relativement bas à la naissance, de l'ordre de 86 µg % , atteint le taux de l'adulte à la deuxième semaine.

L'augmentation du cuivre sanguin, au cours de la grossesse, est due uniquement à l'augmentation du cuivre plasmatique et il en résulte que le rapport cuivre cellulaire / cuivre plasmatique est fortement réduit.

La signification de l'augmentation de la cuprémie au cours de la grossesse n'est pas connue. On a suggéré que cette augmentation représentait une réaction au départ du cuivre du sang maternel vers le sang foetal, mais

cela n'a pu être prouvé. En effet, bien qu'il y ait un déplacement considérable du fer du sang maternel vers le sang foetal, les valeurs du fer plasmatique maternel sont basses, tandis qu'elles sont élevées chez le foetus, exactement le contraire de ce qui se passe, pour le cuivre. Il semble plus probable que l'hypercuprémie de la grossesse soit la conséquence de la stimulation hématopoiétique, la parturiente étant généralement anémiée.

Dans le tableau suivant, sont résumées les variations du cuivre sanguin au cours de certaines maladies et de la grossesse (22).

TABLEAU VI

Variations du cuivre sanguin

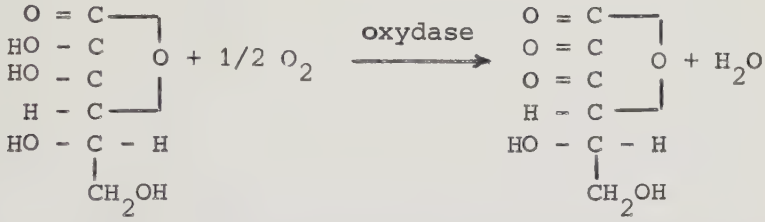
Etat	*Nombre de patients*	*Cuivre du sang total µg %*	*Cuivre plasmatique µg %*	*Cuivre cellulaire µg %*	*Cuivre cellulaire / Cuivre plasmatique*
Normal	23	94 ± 2,2	109 ± 3,5	75 ± 2,7	0,70 ± 0,03
Maladie infectieuse chronique	18	137 ± 5,0	163 ± 7,7	100 ± 5,1	0,64 ± 0,00
Grossesse	11	163 ± 7,6	220 ± 13,2	68 ± 10,5	0,33 ± 0,06
Leucémie aigue	4	206 ± 41,7	227 ± 48,8	151 ± 25,4	0,70 ± 0,09
Leucémie chronique	4	110 ± 9,6	128 ± 9,2	86 ± 17,3	0,67 ± 0,13
Maladie de Hodgkins	3	127 ± 16,0	160 ± 21,0	76 ± 4,4	0,49 ± 0,06
Anémie ferriprive	6	118 ± 6,9	128 ± 9,0	106 ± 19,7	0,90 ± 0,17
Anémie pernicieuse	5	123 ± 9,4	134 ± 7,3	87 ± 20,0	0,64 ± 0,12

RÔLE DU CUIVRE DANS L'ORGANISME

Le rôle joué par le cuivre dans l'organisme est loin d'être parfaitement connu. Comme les autres oligo-éléments, le cuivre est un activateur d'enzymes. Il semblerait qu'il intervienne en outre au cours de l'hématopoïèse, dans le processus de myélinisation du système nerveux central et dans le maintien d'une pigmentation normale.

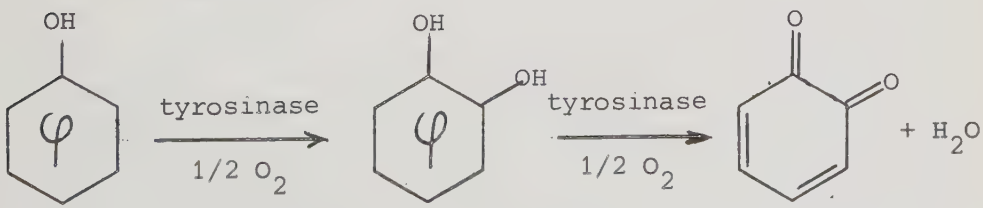
1) *Cuivre et enzymes*

Le cuivre entre dans la composition de *l'acide ascorbique-oxydase*, qui catalyse l'oxydation réversible de l'acide ascorbique au cours des transports d'hydrogène (103,107).



acide ascorbique ($A H_2$) acide dehydroascorbique (A)

On sait depuis longtemps que la tyrosinase est également un enzyme cuprique. Cet enzyme est utilisé dans les réactions d'oxydation aérobie des monophénols.



De même, le cuivre active la *polyphénoloxydase*.

On a cru pendant longtemps que la *laccase*, qui oxyde des diamines diphénols, contenait du manganèse. En fait l'activité de cet enzyme est en relation avec le cuivre sous forme Cu^{+} et Cu^{++} qu'il contient (88).

Le cuivre est également un activateur de la *butyryl-coenzyme A deshydrogénase*, qui au cours du métabolisme des lipides transforme les acides gras saturés en acides gras insaturés.

Enfin, le cuivre maintiendrait l'activité de la *cytochromeoxydase* et de la *catalase* qui contiennent du fer. L'action enzymatique de la cytochrome oxydase au niveau du foie, du coeur, de la moelle osseuse et celle de la catalase des érythrocytes du foie, des reins sont considérablement réduites lors d'une carence en cuivre. Des recherches actuellement en cours sur ce sujet nous apporteront certainement des précisions ultérieurement (32,129).

2) *Cuivre et hématopoïèse*

ELVEHJEM, connu pour ses travaux remarquables sur le fer, mit en évidence les relations du fer et du cuivre, en particulier la participation du cuivre à la synthèse de l'hémoglobine (41).

D'après POLONOVSKI et BRISKAS, le cuivre seul n'aurait aucune action sur la formation de l'hémoglobine, mais agirait sur la génèse des hématies ; le fer nécessiterait obligatoirement la présence de cuivre lors de la synthèse de l'hémoglobine (112). Le cuivre serait donc nécessaire à la mobilisation du fer dans les tissus et à son utilisation pour l'hématopoïèse. En effet, SCHULTZE et MARSTON trouvent une augmentation considérable de fer non utilisé dans les tissus d'anémies cupriprives. HUTCHINSON, dans une étude générale sur la biochimie du cuivre, affirme et démontre la supériorité incontestable de cette association, permettant d'obtenir la guérison d'anémies réfractaires à la seule thérapeutique martiale (69). Confirmation donnée par CHASE, GUBLER, CARTWRIGHT et WINTROBE : la présence de cuivre double l'absorption

gastro-intestinale du fer radioactif (25). Certains auteurs , pourtant, s'appuyant sur le fait qu'hypocuprémie et hyposidérémie ne sont pas toujours parallèles, ne considèrent pas le cuivre indispensable au traitement des anémies.

De plus, il a été démontré, que le cuivre active certains enzymes d'oxydo-réduction, indispensables à l'hématopoïèse. Il peut prévenir, lors des anémies , la diminution du cytochrome A, du cerveau, du foie et du coeur et il facilite la respiration des érytrocytes assurée par le cytochrome.

3) *Cuivre et système nerveux central*

" L'ataxie enzootique", maladie atteignant certains animaux : agneaux et brebis en particulier,et se traduisant par des troubles de la coordination, est la conséquence d'une carence cuprique. Les animaux présentent tous une cuprémie basse avec anémie. Du point de vue anatomo-pathologique, on assiste à une démyélinisation diffuse et symétrique du système nerveux central.

La relation entre la déficience en cuivre et les atteintes du système nerveux central a peut-être pour origine les altérations des oxydases cupriques entrainant des modifications de l'oxydo-réduction. Mais ceci n'est qu'hypothétique.

4) *Cuivre et pigmentation*

Chez l'homme, comme dans le règne animal, le cuivre intervient dans les processus de pigmentation par la tyrosinase cupro-protéique qui catalyse les étapes enzymatiques de la formation des mélanines.

Les mélanodermies s'accompagnent toujours d'hypercuprémie.

- mélanose de RIEHL : 1,95 mg/litre
- naevus pigmentaire étendu : 1,76 mg/litre
- maladie d'Addison : 1,78 mg/litre.

Dans l'albinisme la cuprémie est basse : 0,57 mg/litre. Le cuivre ne peut apporter d'amélioration. Il s'agit vraisemblablement d'une absence congénitale de tyrosinase.

CONCLUSION

L'étude biologique du cuivre repose principalement sur les résultats fournis par l'analyse du sang et du sérum. Le taux du cuivre sanguin est très altéré dans certains états, physiologiques comme la grossesse ou pathologiques comme les maladies infectieuses, les leucémies et les tumeurs malignes. On ne peut dire quelle est la signification de ces altérations du fait que l'on manque encore de connaissances sur le rôle exact du cuivre chez l'homme. Il est évident cependant que cet élément joue un rôle important dans le métabolisme humain.

C H A P I T R E II

RAPPEL DES METHODES DE DOSAGE DU CUIVRE DANS LES MILIEUX BIOLOGIQUES ET EN PARTICULIER LE SERUM

Les méthodes les plus classiques de dosage du cuivre dans les milieux biologiques sont des méthodes colorimétriques. On rencontre également, mais assez rarement, des méthodes utilisant la polarographie ou la spectrographie d'émission. De plus en plus, ces méthodes sont remplacées par des techniques plus récentes : absorption atomique, analyse par activation, dilution isotopique.

METHODES DE DOSAGE COLORIMETRIQUES

Le cuivre forme avec différents réactifs des complexes tétraédriques que nous schématiserons ainsi :

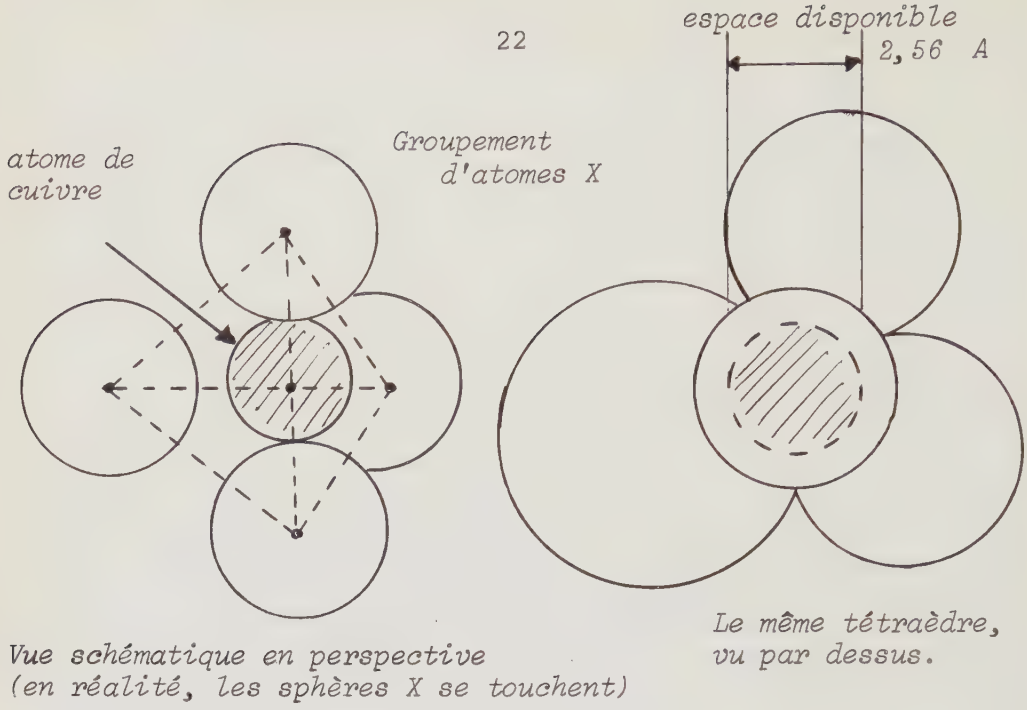


Figure 1 - Complexe du cuivre $Cu^{++} . X^4$

Ces complexes sont colorés et sont utilisés pour le dosage du cuivre.

Les méthodes colorimétriques de dosage du cuivre sont nombreuses. Parmi les réactifs les plus utilisés pour les dosages biologiques, citons : le réactif de DELEPINE (acide diéthyldithiocarbamique) (45, 104), la dithizone (8, 80), la bis-cyclo hexanone-oxalyl-dihydrazone (11), l'oxalyl-dihydrazide (116), le zincon (85), et plus récemment la 1-5 diphénylcarbohydrazide (11), l'inosine (48).

Ces méthodes se heurtent à une double difficulté : faible teneur à mesurer et manque de spécificité des réactifs. Il est impossible, en outre, de les utiliser directement, par suite de la complexité des milieux biologiques. Il devient donc nécessaire de pratiquer une minéralisation préalable à la réaction colorée.

Avant de passer en revue ces différentes méthodes, rappelons-en brièvement le principe.

Principe

Lorsqu'une solution colorée est traversée par un flux lumineux, elle ne laisse passer qu'une fraction de la lumière incidente et l'absorption résultante est liée à la concentration du composé chloré.

L'absorption d'une radiation se fait par passage des molécules d'un niveau d'énergie donné à un autre niveau d'énergie supérieur.

Quand la lumière incidente est monochromatique ou sensiblement telle, la méthode porte le nom de spectrophotométrie.C'est la spectrophotométrie qui est utilisée dans le cas du cuivre.

Le composé à doser doit suivre la loi de BEER-LAMBERT, c'est-à-dire que :

$$\text{Log } \frac{I_o}{I} = K.e.c.$$

où I_o et I sont les valeurs des flux incident et émergent après traversée d'une substance d'épaisseur e (en cm)

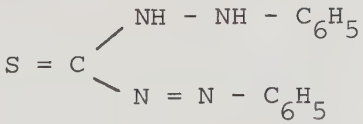
c : est la concentration du corps dissous, en molécules par litres.

K : le coefficient d'absorption moléculaire de la substance absorbante.

Les mesures se font le plus souvent sur des solutions. Il faut donc mesurer l'absorption du solvant et ensuite celle de la solution.

Méthode à la dithizone

Elle est basée sur le principe suivant : la dithizone, ou diphénilthiocarbazone de formule :



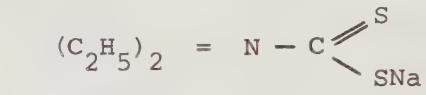
donne avec les sels de cuivre à pH acide, un complexe violet soluble dans le chloroforme et le tétrachlorure de carbone, fortement absorbant à 510 mμ.

BERTRAND (8) recommande cette méthode pour doser le cuivre dans le sérum car en opérant à pH 2,3, cette réaction est spécifique (à l'exception toutefois du mercure et de l'argent, mais ceci ne gène pas dans le cas du sérum).

Cette méthode permet de doser avec certitude et précision le cuivre entre 0,4 et 0,5 µg.

Méthode au diethyldithiocarbamate

Cette méthode utilisée notamment par OKINAKA, YOSHIKAWA, MOZAI et TOYOTA (104) pour doser le cuivre dans le sérum ou d'autres milieux organiques, est basée sur la formation d'un complexe de coloration brun doré lorsqu'on ajoute à une solution cuprique du diéthyldithiocarbamate de sodium de formule :



La matière organique doit être détruite au préalable.

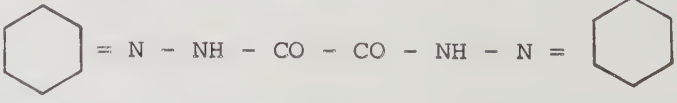
Le complexe formé est extrait de la phase aqueuse avec du tétrachlorure de carbone. La densité optique de la couche tétrachlorocarbonée est mesurée au spectrophotomètre à 435 mµ

De nombreux métaux réagissent avec le diethyldithiocarbamate de sodium, mais si les ions versenate et citrate sont présents dans le milieu toute interférence est éliminée par chélation, sauf pour le bismuth et le tellure.

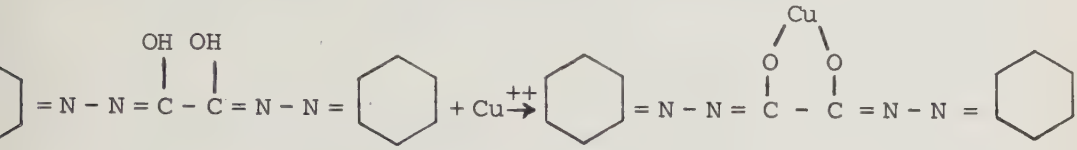
Méthode à la bis-cyclohexanone-oxalyldihydrazone

Cette méthode décrite par BOHUON (11) est basée sur la coloration bleue que donne la biscyclohexanone-oxalyldihydrazone, réactif appelé encore " cuprizon" avec les ions cuivriques.

Ce corps répond à la formule suivante :



Le cuivre Cu^{++} donnerait avec ce corps un complexe coloré bleu, selon le schéma suivant :



Cette coloration est spécifique du cuivre à l'état divalent. Elle apparait entre pH 6,5 et pH 10 environ, mais elle se développe au maximum entre pH 7,5 et pH 8. Elle est partiellement inhibée par les cyanures et les complexons. Elle disparait aux environs de 100 . La coloration montre un maximum d'absorption à 6000A.

Dans le cas du cuivre sérique, on doit faire précéder le dosage d'une ionisation de cet élément et d'une précipitation des protéines.

Méthode à l'oxalyldihydrazide

Méthode décrite par RICE (116) dont voici le principe :

Le cuivre en présence d'acétaldéhyde donne avec l'oxalyldihydrazide, un complexe coloré en violet. La coloration est stable pendant plusieurs heures et suit la loi de BEER-LAMBERT, jusqu'à des concentrations de 5µg dans 3 ml de volume final.

Le dosage doit comme toujours, être précédé d'une ionisation du cuivre et d'une précipitation des protéines.

Cette méthode serait quatre fois plus sensible que la méthode au diethyldithiocarbamate.

Méthode au Zincon

Cette méthode, préconisée par Mc CALL, DAVIS et STEARNS (85) pour doser le cuivre et le zinc dans les milieux biologiques est basée sur la propriété des ions

Cu^{++} et Zn^{++} de former avec le 2 - carboxy - 2' - hydroxy - 5' - sulfoformazylbenzène ou zincon, des complexes colorés en bleu ; le complexe-zinc est stable à pH supérieur à 8,5 - 9,5 , tandis que le complexe-cuivre est stable entre les pH 5 et 9,5 .

On détermine simultanément Cu et Zn en mesurant l'absorption totale des complexes à 610 mμ et en détruisant ensuite le complexe-zinc à l'aide de versenate de sodium (éthylène diamine tetracétate disoque).

En résumé, nous dirons que les méthodes colorimétriques, sont, dans les cas d'échantillons de composition relativement simples, de très bonnes méthodes, permettant d'apprécier les faibles taux (de l'ordre de 1 p.p.m) de cuivre rencontré dans les milieux biologiques. La sensibilité peut évidemment être accrue lorsque l'on dispose de prises assez importantes, mais ceci est rarement le cas pour les liquides biologiques. De plus, toutes ces méthodes exigent la mise en oeuvre de nombreux réactifs, dont la pureté doit être soigneusement contrôlée. Elles se montrent dans l'ensemble, difficiles à appliquer pour les grandes séries.

METHODES DE DOSAGE PAR POLAROGRAPHIE

Introduite vers 1922. par HEYROWSKI, la polagraphie grâce aux travaux de KOLTHOFF en particulier, a pris par la suite une grande extension en tant que méthode de dosage des oligo-éléments.

Le principe général en est le suivant :

On électolyse, sous tension croissante, entre deux électrodes, l'électrode de référence et l'électrode indicatrice, une solution contenant une substance réductible, et l'on enregistre, en fonction des valeurs prises par la tension, les variations de l'intensité du courant qui traverse la solution.

Pour certaines valeurs fixes de la tension dans un milieu donné, l'intensité croît brusquement (potentiel de demi-vague de l'élément).

La valeur de cette tension caractérise qualitativement le métal ; l'amplitutude de la variation de l'intensité définit, après étalonnage, sa concentration.

En milieu ammoniacal, le cuivre donne deux vagues situées à - 0,25 et 0,58 V correspondant aux réactions : Cu II→Cu I et Cu I→Cu

En milieu acide, on observe une seule vague Cu II→ Cu à - 0,03 V.

En solution tartrique ou citrique de pH inférieur à 5 le cuivre donne une seule vague à - 0,02 V.

Le dosage polarographique du cuivre à l'état de traces est un problème classique (67, 78, 102, 133).

Citons à titre d'exemple le dosage du cuivre dans le sang, l'urine ou les tissus de HUBBARD et SPETTEL : (67).

L'échantillon est minéralisé par attaque acide. Le cuivre est séparé sous forme de dithizonate, le cuivre est ensuite extrait du complexe en présence d'eau de brome en milieu sulfurique. Le résidu est mis en dissolution dans du citrate de sodium.

Le polarogramme est enregistré après déplacement de l'oxygène par courant d'azote ; l'étalonnage est fait à partir de quantité de cuivre de 0 à 100 µg dans 3 ml d'électrolyte.

Outre sa sensibilité, jusqu'à 0,2 µg/ml pour le cuivre, cette méthode offre les avantages suivants :

- Possibilité, par le choix d'un électrolyte support convenable, de doser des métaux difficilement séparables par voie chimique, sans risque d'interférence.
- Dosage en une même opération, de plusieurs métaux. Leur nombre est d'ailleurs limité par un écart minimum nécessaire entre les valeurs respectives de leur potentiel de demi-vague caractéristique.
- Lorsque les courbes d'étalonnage ont été établies, et si les conditions expérimentales demeurent les mêmes, cette méthode peut s'adapter à des dosages en série.

Par ses qualités de sensibilité, de spécificité et de précision, la polarographie est une méthode intéressante de dosage des oligo-éléments en général, et du cuivre en particulier.

METHODES DE DOSAGE PAR SPECTROPHOTOMETRIE DE FLAMME PAR EMISSION

La spectrophotométrie d'émission a été parfois proposée (63). En voici le principe:

Un atome excité par une flamme, émet plusieurs radiations lumineuses monochromatiques, qui, convenablement dispersées par un prisme ou un réseau, forment, le "spectre de l'élément excité". Ce spectre est parfaitement déterminé pour une excitation définie et permet de reconnaître avec certitude l'atome émis.

Il suffit, pour doser un métal, de l'exciter, puis de mesurer la quantité de lumière qu'il émet à une des longueurs d'onde qui lui est propre.

Le choix de la méthode de préparation de l'échantillon est essentiellement fonction de la concentration de la solution à analyser. Dans le cas du cuivre, la solution, alimentant la flamme doit renfermer les concentrations suivantes :

- avec la flamme hydrogène-oxygène et mesure directe des émissions : 1 à 100 µg de Cu/ml.
- avec la flamme acétylène-air et photographie du spectre : 0,2 à 20 µg de Cu/ml.

Avant la mesure, la matière organique doit être détruite, les procédés classiques de solubilisation peuvent être utilisés. Le résidu de l'attaque, après élimination de tout excès d'acide, est repris par un acide dilué.

Les courbes d'étalonnage sont établies à partir de séries de solutions synthétiques à teneur croissante en cuivre. Mais les teneurs en cuivre habituellement rencontrées sont trop faibles, en regard de la sensibilité de la technique. Celle-ci exige donc la concentration

du liquide de minéralisation, sans apporter toutefois une précision suffisante.

Une nouvelle branche de cette méthode, l'absorption atomique, toute récente, apporte à la spectrophotométrie, son caractère de méthode absolue, qui ne la rend plus tributaire d'aucune autre méthode et augmente encore sa précision et sa sensibilité.

METHODES DE DOSAGE PAR SPECTROPHOTOMETRIE D'ABSORPTION ATOMIQUE.

Principe

Lorsqu'une radiation spectrale de fréquence donnée traverse une enceinte d'atomes, les phénomènes classiques de résonance, s'accompagnent d'une absorption de la radiation incidente dont on observe une diminution de l'intensité ; les atomes présentent en effet un spectre d'absorption à leur fréquence de résonance.

Les raies d'absorption atomique sont enregistrables et mesurables par les procédés spectrophotométriques classiques. Cependant la largeur des raies d'absorption est trop étroite pour que l'on puisse en mesurer convenablement l'intensité par rapport à un rayonnement incident continu. On est amené à utiliser des radiations incidentes monochromatiques ayant la fréquence de résonance de la raie d'absorption mesurée.

Comme en spectrophotométrie d'absorption moléculaire, on définit pour un atome donné, placé dans des conditions précises, un coefficient d'absorption atomique K défini par la relation :

$$I = Ioe \exp. (-KLC)$$

ou $$\text{Log} \frac{Io}{I} = KLC$$

Où Io est l'intensité de la radiation monochromatique incidente ayant même fréquence que la raie d'absorption mesurée.

I est l'intensité de la radiation après traversée de l'enceinte d'atomes de concentration C, d'épaisseur L.

K coefficient d'absorption atomique qui dépend des conditions auxquelles sont soumis les atomes absorbants :

- température
- pression
- champ électrique
- source d'émission,

en particulier de la largeur de la raie émise et de la transition électronique.

L'absorption du rayonnement est dans des conditions convenables, proportionnelle à l'épaisseur traversée et à la concentration C, c'est-à-dire au nombre d'atomes No de l'élément dans la solution introduite dans la flamme.

L'absorption atomique qui est essentiellement une méthode quantitative a donné lieu à des techniques de dosage précises et spécifiques dans les milieux biologiques.

Cas du cuivre

a) Caractéristiques physiques du cuivre

poids atomique	63,54
point de fusion	1083° C
point d'ébullition	2336° C

Le cuivre possède 29 électrons répartis selon la formule suivante :

$$\underbrace{1s^2}_{K}, \underbrace{2s^2, 2p^6}_{L}, \underbrace{3s^2, 3p^6, 3d^{10}}_{M}, \underbrace{4s^1}_{N}.$$

Cette formule rapproche le cuivre des alcalins, par l'existence d'un seul électron optique "s". En fait, les électrons de la sous-couche 3 d, sont excitables beaucoup plus facilement que ceux des sous-couches p des alcalins ; ils peuvent donc donner lieu à un certain nombre de transitions qui rendent le spectre du cuivre relativement riche comme en témoigne la figure suivante, relative au spectre d'une lampe cuivre/argon .

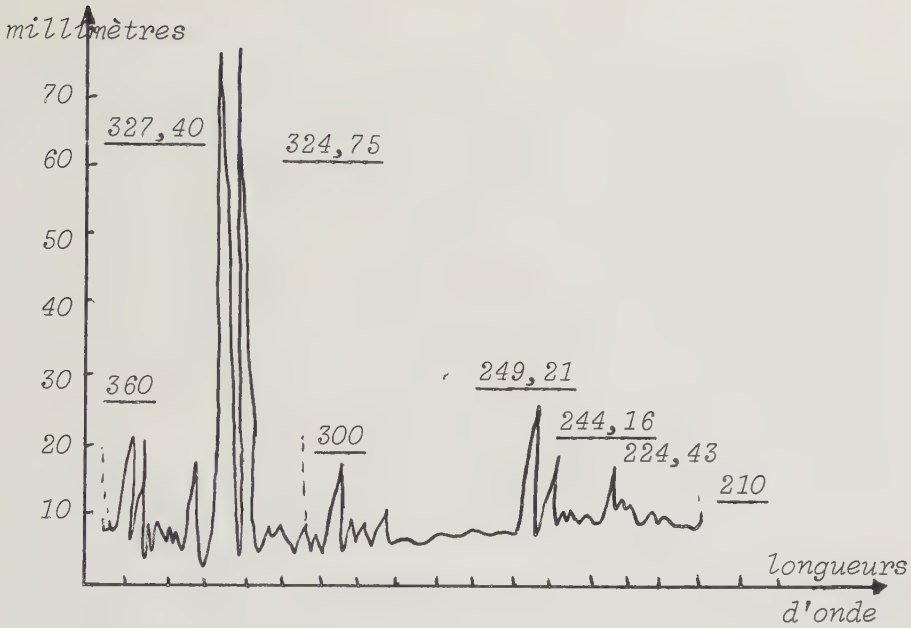


Figure 2 : spectre d'une lampe cuivre/argon (Intensité 10 mA.Fente 1 mm. Résolution 0,65 mm)

La raie de résonance principale se dédouble ; comme dans le cas du sodium, en deux raies voisines de forte intensité, situées respectivement à 324,75 nm (transition $2S_{1/2}$ - $2P_{3/2}$) et à 327;40 nm (transition $2S_{1/2}$ - $2P_{1/2}$) . A côté de ce doublet, on observe un certain nombre de raies faiblement réversibles.

Quant aux raies situées à 510,55 - 570,02 et 578,21 nm, visibles dans les flammes, elles ne sont pas utilisables en absorption.

b) Conditions expérimentales

Une installation pratique d'analyse par absorption atomique comprend d'une façon générale : une source d'émission primaire, une source d'atomisation, un système dispersif : spectrographe ou monocrhomateur d'un type classique, un récepteur photoélectrique, comprenant une cellule à photomultiplicateur d'électrons avec amplificateur et un appareil de mesure galvanométrique.

Dans le cas du cuivre, on utilise, comme source d'émission primaire, une lampe au cuivre. Les lampes à cathode massive de cuivre, sont généralement assez émissives et supportent des intensités de l'ordre de 20 mA.

Les lampes à cathode de laiton, ont l'avantage de permettre à la fois le dosage du cuivre et celui du zinc. L'émission des raies du cuivre, même après plusieurs centaines d'heures de fonctionnement n'est pas affectée par le phénomène de migration du zinc à la surface de la cathode, à qui ce dernier communique un aspect blanchâtre.

La flamme utilisée est soit :

- flamme air/acétylène ($8. 10^{-3}$)
- flamme air/butane ($15. 10^{-3}$)

c) *Applications au dosage du cuivre dans les milieux biologiques*

C'est une méthode très sensible. La sensibilité dépend de l'appareillage. Dans les appareils les plus perfectionnés, on peut détecter jusqu'à 1/1000 µg/ml. Généralement, la sensibilité des dosages est de 1/100 µg/ml.

Cette méthode a été utilisée par de nombreux auteurs pour le dosage du cuivre dans les liquides biologiques ou les organes. (3,6,9,12,24,33,35,42,46,52,59, 71,77,94,97,105).

Pour les liquides biologiques (sérum, urine), il est possible de doser cet élément après une simple dilution aqueuse.

Pour les organes, une simple digestion nitroperchlorique rapide, sur des prises d'essais de l'ordre de 50 ou 100 mg, suffis avant de pratiquer la mesure.

Cette méthode permet de pratiquer des dosages indirects.

En effet le cuivre peut fournir des combinaisons spécifiques avec des substances organiques et permettre ainsi l'estimation indirecte de celle-ci. C'est

en particulier le cas des acides gras dont les savons de cuivre sont susceptibles de s'extraire quantitativement par les solvants organiques comme le chloroforme. Le dosage du cuivre dans la phase organique s'opère alors directement et traduit la teneur en acide gras de la prise d'essai.

METHODES DE DOSAGE PAR RADIOACTIVATION

De nombreux éléments peuvent être dosés à des concentrations très inférieures au microgramme grâce à la radioactivité induite lorsque les échantillons sont exposés au bombardement des particules nucléaires.

L'intensité de la radiation émise après bombardement est directement proportionnelle au poids de l'isotope stable " activé" et peut ainsi servir à la mesure de sa concentration.

En effet lorsqu'un échantillon est soumis à un bombardement de particules de forte énergie (hélions ou neutrons), il y a formation de noyaux radioactifs dans cet échantillon. Le nombre dN de noyaux formés à un instant donné dt à partir de l'élément étudié est exprimé par la différence entre la vitesse de formation des noyaux radioactifs et la vitesse de décroissance de la radioactivité, soit :

$$\frac{dN}{dt} = N_o \cdot \sigma f - \lambda \times N$$

N = nombre de noyaux radioactifs formés à partir de l'élément.
No = nombre de noyaux soumis au bombardement.
σ = probabilité de formation d'une réaction nucléaire particulière ou section efficace de la réaction.
f = intensité du flux des particules irradiantes
λ = constante de décomposition radioactive de l'élément
t = temps du bombardement

par intégration on a :

$$N = No\ \sigma f \left(1 - (\exp - \lambda t)\right)$$

cuivre par comptage β de l'isotope Cu64 de période de 12,9 h et le zinc par le $Zn69m$. La limite d'observation de la méthode est de 4×10^{-10} g pour le cuivre et 5×10^{-8} g pour le zinc. La moyenne pour le cuivre dans le sang de 16 sujets se trouva à 75,5 µg/100 ml, et la moyenne pour le zinc 0,77 mg/100 ml.

PIJCK. GILLIS et HOSTE (110) ont dosé séparément le cuivre et le zinc dans de très faibles échantillons de sang par spectrométrie γ de Cu64 et de Zn65 de période 245 j.

COMAR et coll. (29) ont effectué le dosage simultané du cuivre et du manganèse du sérum sanguin. La moyenne d'une série de 10 dosages sur le même échantillon a été trouvée de 95 µg/100 ml ± 6 % pour le cuivre et de 4,45 µg/100 ml ± 3 % pour le manganèse.

METHODES DE DOSAGE PAR DILUTION RADIOISOTOPIQUE

Le dosage direct d'un élément en solution, rencontre souvent de sérieuses difficultés inhérentes aux caractères physico-chimiques de la solution (pH, présence d'ions génant la réaction mise en oeuvre, couleur, etc...)

Il est nécessaire alors d'envisager l'isolement sélectif de ce métal par un procédé quelconque : précipitation, électrolyse, ou chromatographie par exemple. Cette opération risque souvent de ne pas être absolument quantitative et l'on ne dispose d'aucun moyen pour apprécier le rendement de celle-ci.

La dilution isotopique, et plus particulièrement radio-isotopique, peut dans ce cas, rendre de grands services .

Nous parlerons dans un autre chapitre du principe de cette méthode et nous verrons alors que le dosage d'une substance se résume à deux mesures d'activité spécifique.

RUZICKA et STARY (119), d'une part , BIZOLLON (10) d'autre part, ont dosé par cette méthode le cuivre en solution, à l'état de traces.

Cette détermination est très simple et rapide, car elle consiste, comme nous le verrons ultérieurement, en une extraction incomplète à un pH déterminé du cuivre de la solution à analyser, généralement sous forme de dithizonate et en la mesure de l'activité du composé extrait.

La sensibilité de cette méthode, dépend de la radioactivité spécifique du traceur. On peut doser, grâce à elle, jusqu'à 2/100 µg de cuivre/ml de sérum. La spectrophotométrie par absorption atomique est sans doute supérieure à la dilution radioisotopique, pour les dosages dans les milieux minéraux, mais ceci n'est plus vrai dans les milieux organiques, à cause des phénomènes parasites. De plus la spectrophotométrie par absorption atomique demande une quantité assez importante de liquide (5 à 10 ml environ) et pour en faire une microméthode, il faut un appareil très perfectionné.

CONCLUSIONS

Jusqu'à ces dernières années, seules les techniques colorimétriques ont permis d'apprécier les faibles taux (de l'ordre de 1 p.p.m.) de cuivre rencontrés dans les milieux biologiques. La complexité de ces milieux nécessitait toutefois des manipulations relativement nombreuses, rendant ces méthodes difficilement applicables aux dosages en grande série.

La méthode de dosage par radioactivation, très séduisante, exige toutefois un appareillage couteux et encombrant.

La spectrophotométrie d'absorption atomique apporte une solution particulièrement élégante au problème posé puisqu'il est en effet possible de doser cet élément après une simple dilution aqueuse.

Enfin la méthode par dilution radioisotopique nous semble une méthode de choix, car aux avantages de la méthode précédente, elle joint une sensibilité plus grande.

C H A P I T R E III

RAPPEL SUR LES ISOTOPES RADIOACTIFS DU CUIVRE

Avant de décrire nos méthodes de dosage du cuivre qui ont nécessité l'emploi de cuivre radioactif, il ne nous parait pas inutile de faire un rappel des principaux isotopes radioactifs de cet élément.

L'élément stable est composé de $^{63}_{29}Cu$ (69,09 %) et de $^{65}_{29}Cu$ (30,91 %)

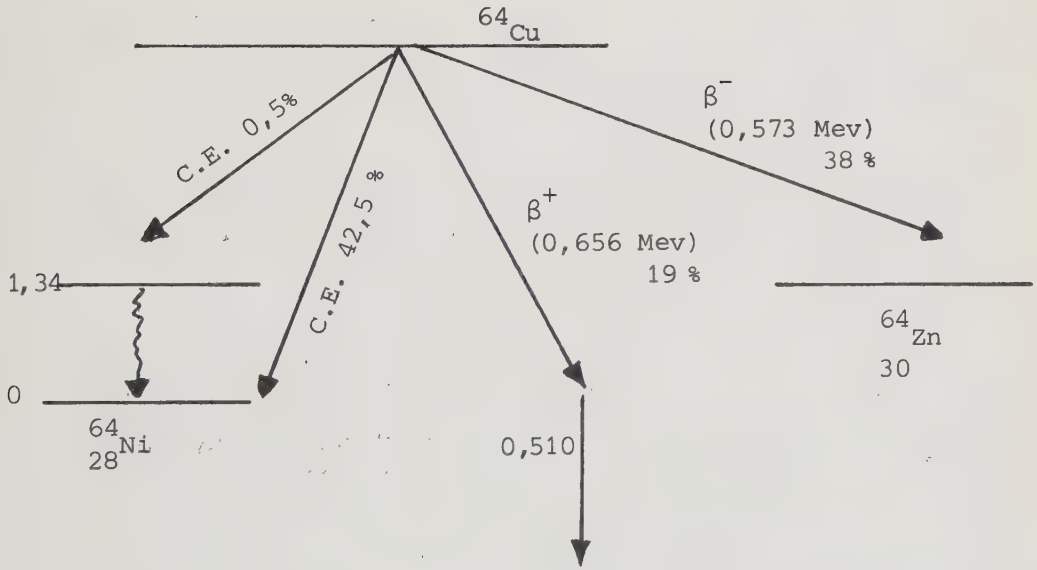
Les isotopes radioactifs du cuivre sont classés dans le tableau suivant :

Tableau des isotopes radioactifs du cuivre

Isotope	*1/2 vie*	*type de décroissance*	*Méthode de production*
Cu60	24 min.	β^+ (93%), C.E.(7 %)	Ni60 (P, n) Ni60 (d,2n)
Cu61	3.3 h	β^+ (68%), C.E.(32%)	Ni58 (α,pn) Ni61 (p,n) Cu63 (γ,2n) Ni60 (d,n) Ni58 (α,p)
Cu62	9.7 min.	β^+	Co59 (α,n) Ni62 (p,n) Cu63 (n,2n) Cu63 (γ,n)
Cu64	12.8 h.	C.E. 43 %, β^- (38%) β^+ (19 %)	Cu63 (n,γ) Ni64 (p,n) Cu65 (γ,n) Zn64 (n,p)
Cu66	5.1 min.	β^- (0,76 Mev 0,2 % (1,59 Mev 9 % (2,63 Mev 91 %	^{65}Cu (n,γ)^{66}Cu
Cu67	61 h.	β^- (0,40 Mev 45 % (0,48 " 35 % (0,58 " 20 %	^{64}Ni (α,p)^{67}Cu

L'isotope radioactif du cuivre le plus utilisé est le Cu64 de période 12,8 heures. Il se désintègre par capture électronique (43 %), émission de particules β^+ (19 %) d'énergie maximum égale à 0,656 Mev, émission de particules β^- (38 %) d'énergie maximum égale à 0,573 Mev. 0,5 % de la capture électronique, amène l'atome de cuivre à un état excité du Ni64, qui se désexcite vers le niveau fondamental avec une raie γ de 1,34 Mev. L'émission β^- amène au Zn64.

Schéma de désintégration du Cu64 :



La détection du Cu64 peut donc en pratique, se faire, soit en mesurant le rayonnement β^- à l'aide du compteur Geiger, soit en mettant en évidence à l'aide d'un compteur à scintillation γ, les photons γ de 0,510 Mev, fournis par l'annihilation du rayonnement β^+. C'est cette deuxième solution que nous avons dû choisir, compte-tenu de notre appareillage. Le rendement de comptage est de l'ordre de 20 % .

Dans nos toutes premières expériences, nous avons utilisé du Cu64 préparé à la Faculté des Sciences de Bordeaux . La réaction de production se fait dans un cyclotron, où sont accélérés des deutons. La cible est composée des isotopes 63 et 65 .

La réaction de production est :

$$^{63}Cu\ (d,p)\ ^{64}Cu$$

C'est une réaction exoénergétique. La seule réaction parasite produite est $^{63}Cu\ (d,T)\ ^{62}Cu$. Mais la période de ^{62}Cu étant de 9,8 minutes, le Cu62 a disparu au bout d'une heure.

Mais la radioactivité spécifique de ce cuivre étant trop faible, nous l'avons abandonné, pour celui préparé au Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay. La réaction de production est :

$$^{63}Cu\ (n,\gamma)\ ^{64}Cu$$

Il n'y a pas d'autre radioélément produit.

Nous avons utilisé la solution chlorhydrique non injectable de chlorure cuivrique marqué au Cu^{64} :

Référence : Cu - 64 - S - 1

pH : 2,5

Concentration en Cu^{2+} : 1 à 2 mg/ml.
Concentration radioactive : 0,5 à 5 mCi/ml
Pureté radioactive : ^{64}Cu > 99 %

Sa radioactivité spécifique est assez variable : 15 à 60 mCi/mg.

C H A P I T R E IV

DOSAGE DU CUIVRE SERIQUE A L'AIDE DE LA METHODE PAR DILUTION RADIO-ISOTOPIQUE

Une des principales difficultés rencontrées par les analystes pour doser une substance contenue dans un milieu très complexe réside dans la purification des produits d'extraction. En effet, celle-ci entraîne quand on recherche une grande pureté, des pertes qu'on ne sait évaluer.

La méthode de dosage par dilution isotopique, encore appelée méthode par variation de l'activité spécifique, résout ce problème dans un grand nombre de cas. Rappelons-en brièvement le principe.

RAPPEL THEORIQUE DE LA METHODE PAR DILUTION RADIOISOTOPIQUE.

Lorsqu'un élément, formé de plusieurs isotopes subit diverses transformations ou traitements chimiques, sa composition chimique reste invariable : autrement dit, si deux isotopes A_1 et A_2 d'un élément A sont en présence, le rapport des concentrations CA_1 / CA_2 est indépendant des traitements chimiques opérés sur l'élément A.

Dans une solution contenant P grammes d'élément inactif à doser, on ajoute p grammes du même élément marqué sous la même forme chimique, et de radioactivité a_1 .

La radioactivité spécifique de l'élément ajouté est :

$$S_1 = \frac{a1}{p} \quad (1)$$

La radioactivité spécifique du mélange est :

$$S_2 = \frac{a_1}{P + p} \quad (2) \text{ or } a_1 = S_1 p$$

donc :
$$S_2 = \frac{S_1 p}{P + p}$$

d'où :
$$P = p \left(\frac{S_1}{S_2} - 1 \right) \quad (3)$$

Si on connait p, S_1 et S_2, on en déduit P

Pour connaître S_1, on prélève un aliquot de masse connue m_1, dont on mesure la radioactivité a_1

$$S_1 = \frac{a_1}{m_1} \quad (4)$$

de même pour S_2 :

$$S_2 = \frac{a_2}{m_2} \quad (5)$$

La détermination de P repose donc sur deux mesures d'activité spécifique. Le grand avantage de cette méthode, réside dans le fait qu'il n'est pas nécessaire d'isoler la totalité de la substance à doser, ni de connaître les pertes qui ont pu se produire au cours de l'analyse. Aussi, cette méthode, proposée pour la première fois par HEVESY et HOBBIE, en 1932, a-t-elle vu son champ d'application, s'étendre progressivement à tous les domaines de la chimie.

Cette méthode s'applique en effet au dosage dans les milieux les plus divers de toute molécule minérale ou

organique, pourvu que l'on puisse "diluer" celle-ci avec une molécule identique, marquée sur l'un de ses atomes : corticostérone, thyroxine, cobalamine, vitamine D; vitamine B_{12} ont fait l'objet de dosages basés sur ce principe.

L'application de cette technique au dosage de métaux à l'état de traces s'est heurtée, par contre, à une difficulté.

La connaissance des activités spécifiques S_1 et S_2, base de ce procédé, implique la détermination précise non seulement des activités a_1 et a_2 (ce qui est relativement facile), mais aussi des masses m_1 et m_2. La sensibilité de l'analyse se trouve souvent limitée par celle de la méthode employée pour mesurer d'aussi faibles masses, inférieures quelquefois à 1 µg.

RUZICKA (J.) et STARY (J.) (119) ont imaginé un procédé qui tourne cette difficulté.

Le rapport des activités spécifiques S_1/S_2 a pour valeur, d'après les équations (4) et (5)) :

$$\frac{S_1}{S_2} = \frac{a_1}{m_1} \times \frac{m_2}{a_2}$$

On s'arrange par un procédé extractif, pour que $m_1 = m_2$. Il en résulte que :

$$\frac{S_1}{S_2} = \frac{a_1}{a_2} \qquad (6)$$

Pour obtenir ce résultat, il faut que l'élément marqué ajouté soit lui-même à l'état de solution S* de concentration connue. On extraira, au moyen d'une même quantité d'un réactif approprié des masses égales m_1 et m_2 de l'élément dans la solution titrée marquée S* et dans la solution à doser S.

Il suffit, pour cela que l'extraction dans S* et S soit incomplète. Dans ces conditions, la mesure des activités a_1 et a_2 des deux échantillons extraits permettra de déterminer P.

RUZIKCA (J.) et STARY (J.) ont appliqué ce procédé au dosage d'un certain nombre de métaux en solution. Chacun de ceux-ci, après dilution radioisotopique, est extrait à un pH déterminé, par un réactif approprié, utilisé en quantité toujours inférieure à celle qui correspond à l'extraction totale du métal dans la solution. Dans ces conditions m_1 et m_2 sont égales et indépendantes de la concentration initiale du métal que l'on dose.

Nous avons voulu appliquer cette méthode au dosage du cuivre sérique. Auparavant, nous avons essayé de la mettre au point sur des solutions minérales aqueuses de cuivre.

MISE AU POINT DE LA METHODE SUR DES SOLUTIONS MINERALES AQUEUSES DE CUIVRE

Principe

Pour l'extraction du cuivre, nous nous sommes inspirés du procédé de BERTRAND (8) qui pour doser le cuivre dans le sérum pratique l'extraction par la dithizone en solution dans le tétrachlorure de carbone au pH 2,3, car BERTRAND insiste sur le fait que si l'extraction du cuivre à ce pH est difficile, elle est spécifique, au moins dans le cas des milieux biologiques.

La méthode consiste donc à ajouter à Pµg de cuivre présent dans un volume V de solution aqueuse, pµg de cuivre marqué par Cu^{64} . Après avoir ajusté le pH de la solution à 2,3, on ajoute de la dithizone, en solution dans le tétrachlorure de carbone, en quantité inférieure à celle nécessaire pour une extraction complète du cuivre. On favorise la formation du dithizonate de cuivre par agitation. On sépare alors la phase organique et l'on mesure l'activité a_2 d'une partie aliquote de celle-ci (Q_2).

Les mêmes opérations sont effectuées avec la même quantité de dithizone sur un même volume de solution aqueuse, renfermant uniquement pµg de cuivre marqué. L'activité a_1 mesurée sur une partie aliquote Q_1 ($Q_1 = Q_2$) permet de connaitre P .

$$P = p \left(\frac{a_1}{a_2} - 1 \right)$$

Appareillage et Réactifs

L'appareil utilisé pour mesurer la radioactivité est un compteur à scintillation cristal-puits SAIP.

Les réactifs sont des produits MERK pour Toxicologie.

Nous avons utilisé :

1 - Eau bidistillée.
2 - Tétrachlorure de carbone bidistillé.
3 - Tampon pH 2,3 :
- 8,3 g phosphate disodique anhydre ;
- 38 g d'acide citrique ;
- 250 ml eau.

4 - Solution de dithizone à 1 mg/litre dans le tétrachlorure de carbone, à préparer extemporanément. Il faut préparer une solution de dithizone à 10 mg/100 ml dans le tétrachlorure de carbone.

Cette solution peut se conserver 8 jours au froid et à l'obscurité.

Au moment de l'emploi, cette solution est diluée au 1/100 pour avoir la solution à 1 mg/l.

5 - Solution de chlorure cuivrique marqué au Cu64. On réalise au moment de l'emploi une solution ayant une concentration en cuivre voisine de 1 µg/ml.

6 - Solution de chlorure cuivrique renfermant 1 µg de cuivre /ml.

Mode opératoire

Dans des erlen meyers bouchant à l'émeri, on verse 2 ml d'une solution de chlorure cuivrique marquée au Cu64 de concentration en cuivre radioactif égale à 1 µg /ml, puis 2 ml d'une solution de chlorure cuivrique

stable de concentration en cuivre variant de 0,25 µg/ml à 1 µg/ml. On ajoute 2 à 3 gouttes d'une solution de rouge de Crésol, servant d'indicateur, et assez d'ammoniaque concentrée pour que le pH soit un peu supérieur à 8 (virage au jaune). On ajoute alors 4 ml de solution tampon. Le pH final est alors d'environ 2,3 .

On complète à 15 ml par addition d'eau distillée, puis on ajoute 1,4 ml d'une solution récente de dithizone à 1 mg/litre dans du tétrachlorure de carbone et l'on extrait le cuivre par une agitation d'une demi-heure.

Le volume de dithizone utilisé ici ne permet qu'une extraction incomplète du cuivre.

On prélève ensuite 1 ml de phase organique, dont on mesure l'activité. Nous avons a_2.

La même opération réalisée sur un flacon témoin ne renfermant que du cuivre radioactif et pas de cuivre stable nous donnera a_1 .

Résultats

TABLEAU I

Dosage du cuivre par dilution radio-isotopique et extraction incomplète .

	Flacons n^os				
	Témoin	*1*	*2*	*3*	*4*
Solution de Cu64 (ml)...	2	2	2	2	2
p µg/ml	1	1	1	1	1
Solution de cuivre stable (ml)	0	2	2	2	2
P µg/ml	0	0,25	0,50	0,75	1
Rouge de Crésol (gouttes)	2 à 3	2 à 3	2 à 3	2 à 3	2 à 3
Ammoniaque concentrée... virage au jaune	qs	qs	qs	qs	qs
Réactif 3 (ml)	4	4	4	4	4
Eau bidistillée (ml) ...	8	6	6	6	6
Réactif 4 (ml)	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4
	(agitation 30 minutes)				
Reprise d'un volume aliquote de la phase organique (ml)	1	1	1	1	1
Activité mesurée sur ce volume (coups/3 minutes) *(1)*	248 181	199 590	163 457	142 479	123 738

(1) Nous donnons ici un des résultats obtenus dans les nombreuses expériences réalisées.

	Calculs de P (en µg/ml)	*valeurs réelles*
Flacon n° 1	$P = 1 \times (\frac{248.181}{199.590} - 1) = 0,24$	0,25
Flacon n° 2	$P = 1 \times (\frac{248.181}{163.457} - 1) = 0,51$	0,50
Flacon n° 3	$P = 1 \times (\frac{248.181}{142.479} - 1) = 0,74$	0,75
Flacon n° 4	$P = 1 \times (\frac{248.181}{123.738} - 1) = 1$	1

Etude des différents facteurs intervenant dans la formation du dithizonate de cuivre.

Avant que la technique soit ainsi mise au point, différents facteurs ont été étudiés, notamment le volume de la solution tampon, la durée de l'agitation et la quantité de solution de dithizone. La solution de cuivre stable utilisée pour ces études a été celle à 1 µg de cuivre stable /ml.

1) Volume de la solution tampon

TABLEAU II

Influence du volume de la solution tampon.

	Flacons n°s					
	1	1'	2	2'	3	3'
Réactif 3 (ml)...	2	[illegible]	4	4	6	6
Activité mesurée (coups/3mn)	2 697	1 385	2 803	1 395	2 742	1 372
Calculs de P (en µg/ml)		0,95		1		0,99

Les flacons 1,2, et 3 sont les témoins correspondants respectivement aux flacons 1', 2' et 3'.

L'addition de 4 ml de solution paraît donc suffisante.

2) Durée de l'agitation

TABLEAU III

Influence de la durée de l'agitation

	Flacons n^{os}					
	1	1'	2	2'	3	3'
Durée de l'agitation (minutes)	5	5	15	15	30	30
Activité mesurée (coups/3mn)	1450	795	1767	930	2830	1395
Calculs de P (en µg/ml)		0,8		0,9		1

Nous voyons qu'après un temps d'agitation de 20 mn, les résultats restent constants.

3) Quantité de dithizone

TABLEAU IV

Influence de la quantité de dithizone

	Flacons n^{os}									
	1	1'	2	2'	3	3'	4	4'	5	5'
Réactif 4 (ml)....	1	1	1,4	1,4	2	2	4	4	6	6
Activité mesurée (coups/3 minutes)	2757	1456	2803	1395	2789	1486	2522	1915	1814	1408
Calcul de P en µg/ml)		0,8		1		0,8		0,3		0,1

La quantité de dithizone à 1 mg/litre est importante à déterminer, puisque la méthode n'est valable que si l'extraction est incomplète.

La quantité de 1,4 ml semble ici donner les meilleurs résultats.

Discussion

1) Sensibilité de la méthode

TABLEAU V

	Flacons n^{os}			
	T	1	2	3
Solution de cuivre stable (2 ml) (P µg/ml)	0	0,1	0,05	0,025
Activité mesurée (coups/ 3 mn)	2478	2231	2345	2406
Calculs de P (en µg/ml) ...		0,11	0,05	0,029

Les résultats obtenus dans nos expériences , et dont nous donnons ci-dessus un exemple, nous montrent que cette méthode est très sensible, puisqu'elle permet de détecter 2/100 de µg/ml.

2) Spécificité de la méthode

Nous savons (142) qu'au pH auquel nous opérons le Zinc n'est pas extrait. C'est pourquoi nous avons étudié seulement l'interférence possible du fer, autre ion pouvant se trouver avec le cuivre et le zinc dans des milieux biologiques.

TABLEAU VI

Influence du fer

	Flacons n°s		
	1	2	3
	Témoin	*Solution à 1 µg de Cu stable/ml*	*Solution à 1 µg de Fe F stable/ml*
Activité mesurée (coups/3 minutes)	3416	1721	3420

Nous voyons d'après ces résultats que le fer n'interfère nullement.

Conclusions

Nous avons mis au point une méthode de dosage du cuivre en solution, par dilution isotopique, après extraction par la dithizone en solution dans le tétrachlorure de carbone au pH de 2,3 (tampon).

Les différents facteurs intervenant dans la formation du dithizonate ont été étudiés, ainsi que l'interférence possible d'autres ions et la sensibilité de la réaction.

C'est une méthode facile à mettre en oeuvre, spécifique et sensible.

APPLICATION AU DOSAGE DU CUIVRE SERIQUE

Prélevement du sang

Le sang doit être recueilli dans des tubes coniques en verre ou des tubes en plastique, préalablement rincés plusieurs fois avec de l'eau bidistillée, puis séchés.

L'heure du prélèvement est importante, car des variations dans le taux de la cuprémie au cours des 24 heures ont été signalées (cf biologie du cuivre). Le maximum serait atteint au cours de la matinée entre 9h30 et 10h30. C'est pourquoi il est recommandé de faire les prélèvements toujours à la même heure.

De plus, il est préférable de ne pas recueillir le sang sur anticoagulant.

Principe du dosage

Le cuivre est, en majeure partie, lié aux protéines sériques : à la coeruloplasmine , principalement, et doit être libéré à l'état ionisé dans le milieu, pour être dosé. Des mesures directes sur le sérum ne permettent, en effet, de mettre en évidence que la très petite fraction du cuivre libre ou très faiblement lié aux protéines.

Une déprotéinisation est, de plus, souhaitable, car elle facilite l'extraction ultérieure du cuivre.

Nous avons choisi d'utiliser l'action de l'acide chlorhydrique dilué, pendant une heure, à la température du laboratoire, pour l'ionisation, suivie d'une déprotéinisation par l'acide trichloracétique. Cette technique est simple à mettre en oeuvre et donne de bons résultats.

On décante le liquide surnageant et on dose le cuivre dans ce liquide suivant la méthode décrite précédemment pour les solutions aqueuses de cuivre : cette méthode consiste à ajouter à la solution à doser une quantité connue de cuivre marqué par Cu64 (pµg). On extrait ensuite le cuivre sous forme d'un complexe avec la dithizone et on mesure l'activité du composé extrait. Les mêmes opérations sont réalisées sur une solution témoin ne contenant que du cuivre marqué par Cu64 (pµg).

Quantité de cuivre à déterminer =

$$P\left(\frac{a_1}{a_2} - 1\right)$$

avec a_1 = activité de la solution témoin

a_2 = activité de la solution à doser.

Réactifs

Tous les réactifs doivent être préparés avec des produits très purs (nous avons utilisé des produits MERK pour toxicologie) et de l'eau bidistillée.

- R 1 Eau bidistillée ;
- R 2 Solution d'acide chlorhydrique 0,2 M ;
- R 3 Solution d'acide trichloracétique à 20 % ;
- R 4 Tampon pH 2,3 :
  - 8,3 g de phosphate disodique anhydre ;
  - 38 g d'acide citrique ;
  - 250 ml d'eau ;
- R 5 Tétrachlorure de carbone bidistillé ;
- R 6 Solution de dithizone à 1 mg/litre dans le tétrachlorure de carbone, à préparer extemporanément à partir d'une solution de dithizone à 10 mg/100 ml dans le tétrachlorure de carbone, qui se conserve huit jours au froid et à l'obscurité ;
- R 7 Solution de chlorure cuivrique marqué au Cu64 . On réalise, au moment de l'emploi, une solution ayant une concentration voisine de 0,5 µg/ml ;

- R 8 Solution de chlorure cuivrique renfermant 1 µg de cuivre/ml.

Mode opératoire

1) Ionisation du cuivre

- Mettre successivement dans un tube à centrifuger :
  . 2 ml de sérum ;
  . 1 ml de HC1 0,2 M (R 2)

- Attendre une heure à la température du laboratoire ;
- Ajouter ensuite 3 ml d'acide trichloracétique à 20 % (R 3) et agiter ;
- Centrifuger dix minutes environ ;
- Prélever le liquide clair surnageant ;

2) Dosage proprement dit

Préparer une gamme de sept tubes :

- Tubes n°s 1 et 2 : ce sont les tubes témoins. Ils ne contiennent que la solution de cuivre marquée au Cu 64 (R 7) : 2 ml ;
- Tubes n°s 3 et 4 : ils contiennent la solution précédente ainsi que la solution étalon de cuivre stable (R 8) 2 ml. Les résultats obtenus ici permettront de vérifier l'absence de contamination des réactifs en cuivre ainsi que la bonne marche de l'expérience ;
- Tubes n°s 5,6 et 7 : dans ces tubes, le dosage proprement dit du cuivre sérique est réalisé . Ils contiennent :
  . tube n° 5 : 2 ml du liquide surnageant précédent ;
  . tube N° 6 : 1 ml " " " "
  . tube N° 7 : 0,5 ml du " " "

(en pratiquant le dosage sur des volumes connus, mais différents de surnageant, nous voulons nous assurer que nous aboutissons à des résultats semblables de la cuprémie).

Dans tous les tubes ajouter :

- solution de chlorure cuivrique marqué au Cu64 .. 2 ml
  puis
- rouge de Crésol et Ammoniaque concentrée ..... quelques gouttes (virage au jaune)
  puis
- solution tampon (R_4) ..... 4 ml
- Eau bidistillée (R_1), q.s..... 10 ml
- Solution de dithizone à 1 mg/litre (R_6) .....1,4 ml

Le cuivre est extrait par une agitation d'une demi-heure. On isole par centrifugation la phase organique renfermant le dithizonate de cuivre formé, on prélève un volume aliquote de celle-ci, dont on mesure l'activité.

TABLEAU I

Mise en oeuvre du dosage du cuivre sérique

	Flacons N^os						
	1	2	3	4	5	6	7
olution de Cu64(ml) p µg/ml	2 0,5	2 0,5	2 0,5	2 0,5	2 0,5	2 0,5	2 0,5
olution de cuivre table par ml.... P µg/ml	0 0	0 0	2 1	2 1	0 0	0 0	0 0
iquide surnageant (ml).....	00	0	0	0	2	1	0,5
ouge de crésol (gouttes).	2 à 3	2 à 3	2 à 3	2 à 3	2 à 3	2 à 3	2 à 3
mmoniaque concentrée virage au jaune.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.
éactif 4 (ml)...	4	4	4	4	4	4	4
au bidistillée (ml)	8	8	6	6	6	7	7,5
éactif 6 (ml)...	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4
	Agitation 30 minutes						
eprise d'un volume liquote de la phase rganique (ml)...	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
ctivité mesurée (coups/minute)..	a_1	a_2	a_3	a_4	a_5	a_6	a_7

Calcul de la masse P de cuivre présente dans 1 ml de liquide surnageant ,

Puisque p = 0,5, on aura :

$$P = 0,5 \left(\frac{a_1}{a_5} - 1 \right)$$

Cuprémie % = P x 3 x 100 (1)

(1) le résultat est multiplié par 3, car au cours de l'ionisation du cuivre, le sérum est dilué au 1/3

Discussion

1) Ionisation du cuivre

Nous avons voulu nous assurer que tout le cuivre du sérum était libéré au cours du traitement du sérum par l'acide chlorhydrique 0,2 M et l'acide trichloracétique à 20 % .

Dans ce but, nous avons effectué à partir du même sérum deux séries de dosage, l'une sur du sérum préparé, comme il est indiqué plus haut, et l'autre sur du sérum préalablement minéralisé, selon la méthode nitrosulfurique de DENIGES.

La minéralisation s'opère sur 2 ml de sérum auquel on ajoute 1,3 ml d'acide nitrique et 0,4 ml d'acide sulfurique. Quand la destruction est achevée, on introduit 2 ml d'eau bidistillée et 0,4 ml d'une solution saturée d' hydroxylamine. On chauffe alors, de manière à réduire le volume de moitié. Le liquide ainsi obtenu est finalement neutralisé avec de l'ammoniaque, cette neutralisation s'étant avérée nécessaire pour le dosage ultérieur du cuivre.

Les résultats en cuivre que nous avons obtenus sont plus élevés que par la méthode à l'acide chlorhydrique dilué, mais la différence n'excède jamais 5 %, ce qui prouve que la méthode que nous utilisons est parfaitement valable.

2) Reproductibilité de la méthode

Plusieurs expériences ont été réalisées sur chaque échantillon de sérum, en une fois ou à deux ou trois jours d'intervalle, afin d'étudier la reproductibilité de la méthode.

Celle-ci est bonne, car tous ces dosages ont conduit à des résultats très voisins (les écarts trouvés n'ont jamais dépassé 5 %).

3) Sensibilité de la méthode

Pour cette étude, nous avons appliqué la méthode à des dilutions croissantes de liquide surnageant, en utilisant toujours une masse de cuivre marqué au Cu64, correspondant à peu près à la quantité de cuivre stable présent normalement dans 1 ml de liquide surnageant.

On dose ainsi les quantités de cuivres comprises entre 0,20 et 1,80 µg dans 1 ml de sérum, limites qui encadrent bien les valeurs que peut prendre le cuivre sérique dans les cas normaux ou pathologiques.

Il est possible d'appliquer cette méthode à des concentrations en cuivre plus petites ou plus grandes ; il suffit pour cela de modifier la masse de cuivre marqué au Cu64 que l'on ajoute au milieu réactionnel, masse qui doit être toujours assez voisine de celle que l'on veut doser.

En modifiant cette masse, on peut arriver à doser jusqu'à 0,02 µg de cuivre dans la prise d'essai, d'où l'avantage de pouvoir, par cette méthode, opérer sur un volume de sérum très réduit (0,2 ml), ce qui est intéressant parfois (cas de très jeunes enfants).

4) Comparaison des résultats obtenus par dilution radio-isotopique, par colorimétrie, et par absorption atomique.

La méthode colorimétrique que nous avons utilisée comme méthode de comparaison est la méthode à l'oxalyldihydrazide (116).

Pour les mesures d'absorption atomique, nous avons utilisé un techtron modèle AA_4, en utilisant comme gaz le mélange air-acétylène. La longueur d'onde choisie pour la mesure est de 3247,5 Å , car elle correspond au maximum de sensibilité pour le cuivre. On opère directement sur le sérum préalablement dilué au 1/4.

Nous donnons les résultats obtenus par ces trois méthodes sur dix sérums différents : (n'ayant pas eu suffisamment de sérums pathologiques interessants, nous avons expérimenté sur des sérums normaux).

TABLEAU II

Comparaison des méthodes par dilution radio-isotopique, à l'oxalyl-dihydrazide, et par absorption atomique.

N° échantillon de sérum	*Cuprémie (µg de cuivre/100 ml de sérum)*		
	Méthode par dilution radio-isotopique	*Méthode volumétrique*	*Méthode par absorption atomique*
1	112	98	115
2	108	106	110
3	115	114	115
4	123	120	126
5	95	90	92
6	134	130	135
7	115	111	114
8	102	100	102
9	114	114	115
10	112	110	110

Les chiffres de cuprémie indiqués représentent la moyenne arithmétique des diverses valeurs obtenues.

Les trois méthodes conduisent à des résultats très voisins, mais presque toujours légèrement supérieurs dans le cas de la méthode par dilution radio-isotopique.

Conclusions

Cette méthode de microdosage du cuivre sérique consiste en une extraction du cuivre sous forme de dithizonate au pH 2,3, et en la mesure de l'activité du composé extrait et comparaison avec un témoin.

C'est une méthode simple et rapide, ne nécessitant pas de minéralisation préalable du milieu.

Au point de vue spécificité, nous avons apporté une amélioration en choisissant, un pH d'extraction, où le zinc notamment n'est pas extrait.

C'est en outre une méthode sensible puisqu'elle permet de doser jusqu'à 0,02 µg de cuivre dans la prise d'essai.

C H A P I T R E V

DOSAGE DU CUIVRE SERIQUE PAR FIXATION COMPETITIVE SUR UNE PROTEINE

INTRODUCTION

Après ce premier travail, nous avons voulu mettre au point, une méthode de dosage du cuivre, qui, tout en présentant une bonne spécificité, permettrait d'obtenir une meilleure sensibilité que la précédente.

Nous avons tout naturellement pensé aux méthodes de dosage basées sur l'emploi d'un "agent liant" spécifique, mieux connues sous le nom général de méthodes de dosage par "compétition" et qui englobent les tests de compétition sur protéine porteuse, les tests radioimmunologiques et les tests radioenzymatiques, pour ne citer que les principaux. Ces méthodes de dosage qui se sont considérablement développées depuis 1960 à la suite des travaux d'EKINS (39) sur le dosage de la thyroxine et de ceux de YALOW et BERSON (149) sur le dosage de l'insuline, permettent d'atteindre des concentrations aussi basses que 10^{-12} mole/litre pour la vitamine B_{12} et l'insuline et au moins 10^{-10} mole/litre pour de nombreux dérivés hormonaux.

La mise en oeuvre de ces méthodes nécessitent l'emploi d'un "agent liant" spécifique, qui sera le plus souvent une protéine porteuse ou un anticorps pouvant réagir spécifiquement avec le composé à doser, appelé aussi

effecteur ou ligand. La réaction obéit en général à la loi d'action de masse et aboutit à un état d'équilibre qui dépend des concentrations relatives des composants. Cet équilibre peut être "révélé" par l'addition d'une faible quantité d'un traceur radioactif, dans la plupart des cas, aussi identique que possible au composé à doser.

Dans le problème qui nous préoccupe où l'effecteur est du cuivre, l'agent liant spécifique sera constitué par la coeruloplasmine ou l'un de ses dérivés et le traceur par le cuivre 64 déjà utilisé dans la première partie de notre cravail.

Avant d'aborder l'étude de la réaction proprement dite, il ne nous parait pas inutile de rappeler le support théorique de ces réactions de compétition et l'allure des courbes représentatives du phénomène.

RAPPEL THEORIQUE SOMMAIRE SUR LES REACTIONS DE COMPETITION

Les études théoriques sur les réactions de compétition, ont été surtout développées par EKINS (40) d'une part et YALOW et BERSON (149) d'autre part et constituent une extension des études de SCATCHARD (124) sur les combinaisons des protéines avec de petites molécules. On peut les résumer de la manière suivante :

Lorsque l'on met en présence un agent liant spécifique, qui dans notre cas est une protéine porteuse, avec un effecteur ou ligand, une partie du ligand se lie à la protéine et le reste demeure à l'état libre. On aboutit donc à un état d'équilibre qui dépend des concentrations relatives en protéine et effecteur et on admet que cet équilibre obéit à la loi d'action de masse.

Dans le cas particulier, où on considère un effecteur univalent et une protéine possédant une seule sorte de sites porteurs, si on appelle P la protéine et Q l'effecteur, on pourra écrire :

$$P + Q \rightleftharpoons PQ$$

où PQ représente l'effecteur lié à la protéine.

Si on applique la loi d'action de masse, on aura :

$$\frac{(P) \cdot (Q)}{(PQ)} = K \qquad (1)$$

où K est la constante d'équilibre de la réaction.

Il est facile de voir que, pour une même concentration de la protéine, si la concentration de l'effecteur est modifiée, l'équilibre se déplace et le rapport $\frac{(Q)}{(PQ)}$ varie.
L'étude de la variation de ce rapport permet donc de doser l'effecteur. Dans ce but, on introduit dans le milieu, à l'état de traces, un composé radioactif Q^*, aussi identique que possible de Q, et qui pourra réagir avec P.

On aura : $P + Q^* \rightleftharpoons PQ^*$

et

$$\frac{(P) \cdot (Q^*)}{(PQ^*)} = K^* \qquad (2)$$

K^* peut être identique ou différent de K. Dans notre cas, nous pensons que K ne doit pas être très différent de K^*, du fait de la faible différence des masses des 2 éléments.

Si donc, dans un milieu réactionnel, on introduit une quantité donnée de protéine et d'effecteur radioactif Q^*, et des quantités variables d'effecteur à doser Q, il se produit un phénomène de compétition entre l'effecteur radioactif et l'effecteur non radioactif pour l'occupation des sites de la protéine et on aboutit à un équilibre :

$$P + Q + Q^* \rightleftharpoons PQ + PQ^* \qquad (3)$$

qui obéit lui aussi à la loi d'action de masse.

La valeur du rapport $\frac{(Q^*)}{(PQ^*)}$ dépend de la concentration de l'effecteur non radioactif. En effet, toute addition d'effecteur non radioactif va s'accompagner d'un déplacement de l'effecteur radioactif et ce déplacement est proportionnel à la quantité d'effecteur ajouté : (Q^*) augmentera, tandis que (PQ^*) diminuera.

Pour mesurer ce rapport, on est donc amené lorsque l'équilibre est atteint, à séparer l'effecteur libre de celui qui est combiné, de manière à mesurer les radioactivités correspondant soit à (Q^*) soit à (PQ^*), étant bien entendu que, si l'on appelle q^* la concentration initiale en effecteur radioactif, on doit avoir :

$$q^* = (Q^*) + (PQ^*)$$

En réalisant une série de mesures pour des concentrations connues et différentes de l'effecteur que l'on veut doser, il est possible d'obtenir une courbe de dosage standard.

Nous allons voir maintenant quelle est l'allure des courbes que l'on doit obtenir et la manière dont on peut représenter le phénomène.

Si l'on part de l'équation (1), on peut par exemple représenter le phénomène, en traçant la courbe qui traduit la variation de $\frac{(Q)}{(PQ)}$ en fonction de la concentration initiale en effecteur q. Si l'on appelle p, la concentration totale en protéine porteuse on aura :

$$(P) = p - (PQ)$$

et $$(Q) = q - (PQ)$$

Si l'on pose : $$R = \frac{(Q)}{(PQ)}$$

On tire : $$(PQ) = \frac{q}{R + 1}$$

(on peut également obtenir des équations du même genre pour (P) et (Q),
et en portant ceci dans l'équation (1), on obtient :

$$K \left(q - \frac{q}{R - 1}\right) \left(p - \frac{q}{R - 1}\right) = \frac{q}{R + 1}$$

Que l'on peut écrire sous la forme :

$$R^2 + R\left(1 + \frac{q}{p} - \frac{1}{Kp}\right) - \frac{1}{Kp} = 0$$

Ou encore

$$\frac{1}{R} = \frac{p}{\frac{q}{1 + 1/R} + \frac{1}{K}}$$

La représentation de R en fonction de q conduit à une hyperbole, dont on ne conserve, bien sûr, que la portion de branche correspondant aux valeurs positives de R et q. Cette portion de branche peut d'ailleurs pratiquement le plus souvent être assimilée à une droite, de sorte que l'on a une représentation du phénomène pratiquement linéaire. Ceci est le mode de représentation préconisé par EKINS, c'est celui que nous avons choisi (figure 1 a) .

YALOW et BERSON, au contraire, étudient le phénomène en suivant les variations de $\frac{(PQ)}{(Q)}$, c'est-à-dire de 1/R en fonction de q. Il est facile de démontrer que là encore, l'équation que l'on obtient est celle d'une hyperbole, différente, bien entendu, de la précédente, et dont ici encore, on ne garde que la portion de branche correspondant aux valeurs positives de R et q. Mais cette fois, l'allure de la courbe est bien un arc d'hyperbole et ne peut être assimilée à une droite (figure 1 b).

Le fait d'introduire le traceur radioactif, c'est-à-dire de partir de l'équation (3), conduit évidemment à une équation plus compliquée mais l'allure des courbes représentatives reste la même. Dans ce cas, on suit la variation de $R^* = \frac{(Q^*)}{(PQ^*)}$, ou de son inverse, en fonction, toujours, de q.

Il existe, bien entendu, d'autres modes de représentation possibles, on peut remplacer le rapport des concentrations par le rapport des pourcentages de radioactivités des 2 fractions libre et liée, ce qui revient d'ailleurs au même. On peut également suivre les variations du pourcentage de la radioactivité liée en fonction de q, ce qui fournit une portiond'hyperbole, ou son inverse qui conduit à une représentation sensiblement linéaire.

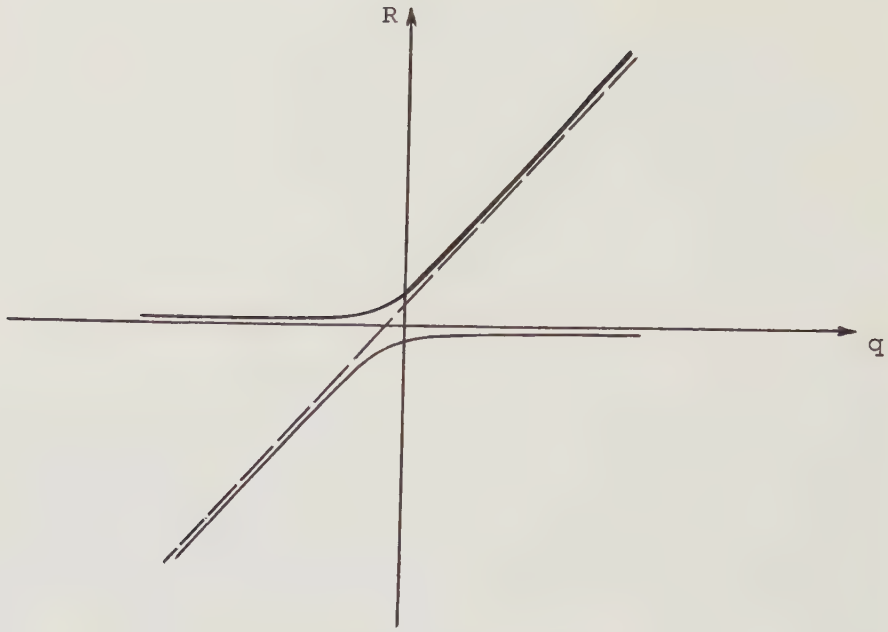


Figure 1a

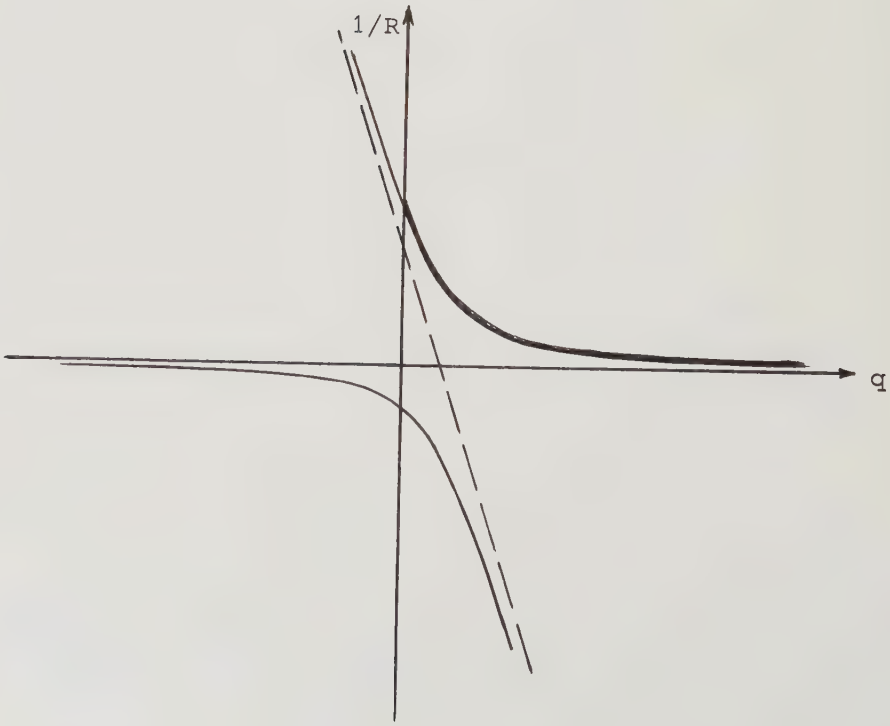


Figure 1b

On peut aussi comme RODBARD (118) opter pour une représentation également linéaire en portant en abscisse le logarithme de q et en ordonnée le logit de $\frac{(PQ^*)}{(Q^*)}$.

Lorsque la protéine porteuse comporte plusieurs sortes de sites correspondant à des constantes de réaction de valeurs différentes, l'équation représentative du phénomène n'est plus en général celle d'une hyperbole et la représentation de R en fonction de q ne peut être assimilable à une droite que dans un certain intervalle de concentration en effecteur, ou même ne pas être linéaire du tout.

Après l'équation des courbes, disons quelques mots sur le problème de la sensibilité de la réaction, qui est important. EKINS d'une part, et YALOW et BERSON d'autre-part, abordent ce problème de manière différente, mais arrivent aux mêmes conclusions. On peut définir la sensibilité comme étant la plus petite valeur de q, soit Δq, susceptible de modifier la distribution de la radioactivité; de sorte que R varie d'une quantité Δ R où ΔR est égal à la déviation standard de Ro, Ro étant la valeur du rapport $\frac{(Q^*)}{(PQ^*)}$, lorsque la concentration en effecteur non marqué est nulle, ce qui correspond à ce que nous appellerons par la suite, le "blanc" de la réaction.

Les développements mathématiques donnés par EKINS (40) démontrent que dans une réaction de compétition, ce maximum de sensibilité est atteint quand Ro = 1 si l'on ne tient compte, dans les erreurs expérimentales, que des erreurs de comptage. La sensibilité est alors donnée par l'expression :

$$\Delta q = \frac{4\sqrt{2}}{\sqrt{KSVT}}$$

où K est la constante de la réaction.
S la radioactivité spécifique du traceur
V le volume de la réaction
T le temps de comptage.

Et on doit avoir : $p = \frac{3}{K}$ et $q^* = \frac{4}{K}$

Cependant, lorsque l'on tient compte des erreurs autres que celles de comptage, EKINS montre que la sensibilité maxima est atteinte pour des valeurs de Ro qui peuvent être supérieures à 1.

ESSAIS PRELIMINAIRES

A- *Essais sur le sérum*

Nous avons tout d'abord essayé de réaliser cette réaction directement sur le sérum.

Le sérum contient on le sait, environ 0,3g/l de coeruloplasmine.

Nous avons effectué des dilutions de sérum au 1/30 ou au 1/50 dans de l'eau distillée, et nous y avons ajouté pour 20 ml de dilution, 0,5 ml d'une solution de cuivre 64 à 1 µg/ml.

Nous avons introduit 2 ml de ce mélange dans des tubes à centrifuger , contenant déjà 1 ml d'une dilution de cuivre variant de 0 à 100 µg/ml. Cette gamme est préparée à partir d'une solution étalon de cuivre (1). Un tube supplémentaire qui ne contient pas de cuivre sert de témoin.

Les différents tubes sont plongés dans la glace fondante et agités pendant une demi-heure.

Nous séparons ensuite le cuivre qui a réagi avec la protéine de celui qui est resté libre. Dans ce but, nous ajoutons 4 ml d'une solution de $(NH_4)_2 SO_4$ à 50 %, qui précipitera les protéines dans tous les tubes, sauf le tube témoin, où ils sont remplacés par 4 ml d'eau distillée. Après 5 minutes de contact, une centrifugation de

(1) Cette solution étalon de cuivre est la même que celle que nous avons déjà utilisée dans la première partie de notre exposé.

15 minutes à 4000 tours /minute est réalisée. On prélève ensuite 2 ml de surnageant, dont on mesure l'activité pendant une minute au cristal-puits. Cette activité correspond à du cuivre non fixé sur la protéine. Ceci permettra de calculer le pourcentage de radioactivité libre, puis par différence, le pourcentage de radioactivité fixé sur la protéine.

Voici les résultats tirés de l'une de ces expériences, sur du sérum dilué au 1/30. (Tableau I)

TABLEAU I

Essais sur le sérum

Numéro des tubes	*Témoin*	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*
Concentration en cuivre en µg/ml de la gamme	0	0	0,1	1	10	100
Radioactivité des 2 ml de surnageant en c.p.m.	8615	6920	7120	7135	7341	8050
% de la radioactivité fixée sur les protéines.		19,5	17,5	17,2	15	6,5

Ces résultats mettent en évidence, une fixation faible du cuivre, variant assez peu avec la concentration en cuivre.

Des modifications opératoires portant sur le taux de dilution du sérum, la concentration en cuivre 64, les temps de réaction et les techniques de séparation du cuivre libre et du cuivre combiné, n'ont pas sensiblement modifié ces résultats.

Nous avons pour cela, fait incuber un sérum non dilué avec environ 10 µCi de cuivre 64. Après une demi-heure de contact au réfrigérateur, nous avons

effectué des électrophorèses sur papier en tampon véronal pH 8,6 . Après révélation au bleu de bromophénol, les diverses fractions protéiques ont été découpées , puis comptées.

Nous avons ainsi pu mettre en évidence que, près de 80 % de la radioactivité fixée, l'était au niveau des albumines, le reste se répartissant sur les autres fractions de la manière suivante : moins de 6 % sur les α-globulines, qui contiennent, on le sait, la coeruloplasmine, 2 % sur les γ-globulines et 10 à 12 % sur les β-globulines.

Ces électrophorèses mettent bien en évidence d'une part, le fait que la coeruloplasmine se comporte comme une protéine pratiquement saturée en cuivre non échangeable, ce qui est en accord avec les travaux de SCHEINBERG et MORELL (101,125) et ceux de KASPER et DEUTSCH (75) notamment, et d'autre-part le fait que l'albumine est susceptible de fixer des quantités importantes de cuivre et que pour cette raison, elle doit être, autant que possible, éliminée de tout dosage.

B- Essais sur la coeruloplasmine elle-même

Nous avons alors décidé de travailler, non plus sur le sérum mais sur la coeruloplasmine elle-même, afin de réduire au maximum, les interférences possibles avec d'autres protéines.

Il faut noter cependant, que la coeruloplasmine que nous avons utilisée (1) ne présente pas un degré de pureté de 100 % . La coeruloplasmine absorbe en effet à 280 nm comme toutes les protéines, ce qui permet de doser l'azote, mais aussi à 610 nm, cette absorption étant en rapport avec sa concentration en cuivre. Une mesure du rapport des coefficients d'absorption à 610 nm et à 280 nm, permet d'évaluer, avec une assez bonne précision la pureté d'un échantillon de coeruloplasmine (17,34).

(1) ceruloplasmin (human) subfractionation lyoph. SCHWARZ/MANN.

Pour une coeruloplasmine pure le rapport est :

$$E^{610\ nm}_{1\%1cm} / E^{280\ nm}_{1\%\ 1cm} = 0,042$$

Pour notre coeruloplasmine, nous avons trouvé pour ce même rapport une valeur de 0,034 (la mesure a été effectuée sur un spectrophotomère BECKMANN D.B.) ce qui correspond à une coeruloplasmine à 80-85 % de pureté . Une électrophorèse de contrôle sur papier, en tampon véronal pH 8,6, montre, après coloration au bleu de bromophénol, la présence de β-globulines et d'albumine, comme impuretés. Une mesure photométrique permet d'évaluer le pourcentage des β-globulines à 5 % et celui des albumines à 4 % . Ces pourcentages d'impuretés sont suffisamment faibles pour ne pas créer d'interférences gênantes. Un essai rapide nous a d'ailleurs montré que cette coeruloplasmine mise en présence de cuivre 64 fixe moins de 3 % de la radioactivité initiale.

Le problème à résoudre était donc, soit de déplacer le cuivre de la coeruloplasmine, dans le milieu réactionnel, de manière à ce qu'une réaction d'échange puisse s'effectuer soit d'opérer non plus avec la coeruloplasmine, mais avec l'apocoeruloplasmine, c'est-à-dire la coeruloplasmine débarrassée de la majeure partie de son cuivre.

Voyons tout d'abord les essais réalisés sur la coeruloplasmine :

On sait qu'en présence d'un réducteur convenable, dont le plus utilisé est l'acide ascorbique, la coeruloplasmine se décolore rapidement, son cuivre passant de l'état Cu^{++} à l'état Cu^{+}, devient alors mobile; (65,125).

Nous avons donc réalisé une expérience analogue, à celle décrite lors de nos premiers essais avec le sérum dilué au 1/30, mais cette fois, la dilution de sérum a été remplacée par une solution de coeruloplasmine à 0,2 mg/ml et nous avons ajouté au milieu réactionnel de l'acide ascorbique (5mg d'acide ascorbique par ml de milieu réactionnel).

Nous espérions que l'acide ascorbique présent en réduisant le cuivre lié à la coeruloplasmine, le rendrait mobile, et qu'ainsi une réaction d'échange pourrait se produire.

Voici les résultats obtenus : (Tableau II)

TABLEAU II

Essais sur la coeruloplasmine elle-même

Numéro des tubes	*Témoin*	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*
Concentration en cuivre en µg/ml de la gamme	0	0	0,1	1	10	100
Radioactivité de 2 ml de surnageant en c.p.m.	7740	6185	6565	7130	7500	7660
% de radioactivité fixée sur la protéine		20,2	15,3	7,9	3,1	1

Ces résultats ne sont pas très satisfaisants, le pourcentage du cuivre radioactif fixé par le tube n°1, correspondant au blanc en particulier, est nettement trop faible.

Des modifications portant sur la concentration en acide ascorbique ou sur le pH du milieu réactionnel, n'ont guère apporté d'améliorations.

Néanmoins, ces résultats montrent qu'il est possible d'arriver à une réaction de compétition en libérant un nombre suffisant de sites porteurs de cuivre sur la protéine.

C'est pourquoi, nous avons alors essayé de préparer une apocoeruloplasmine.

PREPARATION DE L'APOCOERULOPLASMINE

A- Première méthode

Il existe plusieurs façons d'obtenir l'apocœruloplasmine. Rappelons le principe de la méthode de SCHEINBERG et MORELL (101,125) : ces auteurs déplacent le cuivre de la cœruloplasmine, par action de l'acide ascorbique à un pH convenable. Le cuivre déplacé et l'excès d'acide ascorbique sont ensuite retenus par passage de la solution, sur des résines échangeuses d'ions, anioniques et cationiques.

Voici la première méthode que nous avons utilisée, voisine de celle décrite par SCHEINBERG et MORELL.

Appareillage et réactifs

→ Tampon acétate pH 5,6.

On prépare une solution A contenant 0,6 g d'acide acétique cristallisable pour 50 ml d'eau bipermutée, puis une solution B contenant 2,72 g de Na C00 CH_3, $3H_{20}$ pour 100 ml d'eau bipermutée.

Le tampon est obtenu en mélangeant :

(solution A ..... 4,8 ml
(solution B ..... 45,2 ml
(eau bipermutée ..... q.s. 100 ml

→ Colonne de résines échangeuses d'ions de 1,5 cm de diamètre et de 50 cm de long.

Cette colonne contient 25 cm de Dowex 50 x 8 cationique mise sous forme sodique, surmontés de 25 cm de Dowex 1 X 8 anionique mise sous forme acétate.

La préparation de chacune de ces résines, a été faite de la manière suivante :

La Dowex 50 x 8, se trouve initialement sous forme H^+. Il faut en premier lieu la débarrasser de ses grains les plus fins par 2 ou 3 lavages à l'eau, suivis d'agitation et de décantation (on rejette la suspension colloïdale formée avec l'eau par les grains les plus fins).

La résine est alors transvasée dans une colonne en verre. On la traite tout d'abord avec 2 volumes d'HCl à 5 %, et on la rince avec 4 volumes d'eau bipermutée. On la traite ensuite par 8 volumes de NaCl à 5 % et on rince à nouveau par 10 volumes d'eau bipermutée.

Toutes ces opérations se font évidemment en écoulement continu avec un débit de l'ordre de 2 ml/minute. A la fin, le pH de l'effluent est de l'ordre de 7.

La Dowex 1 x 8, se trouve, elle, initialement sous forme Cl^-. Elle aussi est lavée afin d'éliminer les grains les plus fins, puis mise dans une colonne en verre où elle sera successivement traitée en écoulement continu par 20 volumes de NaOH à 6 %, puis 2 volumes de Na_2CO_3 à 6 %, rincée par 15 volumes d'eau bipermutée puis par $H COO CH_3$ à 5 % jusqu'à ce que le liquide d'écoulement devienne acide et enfin rincée jusqu'à neutralité.

On réalise alors la colonne à lits superposés de résines cationique et anionique et cette colonne est équilibrée avec le tampon acétate pH 5,6 .

Nous avons évidemment vérifié, que ce système est bien capable de retenir le cuivre et l'acide ascorbique . Nous l'avons dans ce but , fait traverser par 10 ml d'une solution préparée à l'aide du tampon et contenant 100 mg d'acide ascorbique et une quantité de cuivre 64 correspondant à 30 000 c.p.m. Sous la colonne, l'action réductrice de l'acide ascorbique sur le 2-6 dichlorophénol indophénol , ne peut plus être mise en évidence, et l'activité totale est négligeable.

Mode opératoire

Nous préparons une solution de coeruloplasmine à 10 mg/ml dans le tampon acétate pH 5,6 et contenant 5 mg/ml d'acide ascorbique.

Nous mettons 10 µl de cette solution pendant 4 heures au réfrigérateur à 4°.

Nous observons une rapide décoloration de cette solution initialement bleue.

Les 10 ml de la solution de coeruloplasmine ainsi traitée, sont alors introduits sur la colonne et élués par le tampon. Le débit est réglé à environ 10 gouttes/minute, et l'effluent recueilli sur un collecteur de fractions réglé pour un volume de 1 ml.

Une expérience préalable, nous avait montré que l'on recueille la quasi-totalité de la fraction protéique sur un volume de 12 ml. Une mesure de l'absorption à 280 nm montre que ce volume contient 78 à 83 % des protéines de départ, soit une concentration moyenne de 6,66 mg d'apocoeruloplasmine/ml.

Un dosage du cuivre restant fixé sur cette apocoeruloplasmine, par la méthode à l'oxalyldihydrazide, nous a donné 8,6 µg de cuivre pour 10 mg d'apocoeruloplasmine, ce qui correspond sensiblement à 2,5 atomes de cuivre par molécule. On est donc assez loin d'une absence complète de cuivre sur la molécule. Cependant, cette apocoeruloplasmine est incapable de fixer du cuivre si celui-ci n'est pas à l'état d'ion cuivreux. Nous l'avons constaté expérimentalement. En effet, en présence du seul cuivre radioactif (blanc) cette protéine fixe moins de 5 % de la radioactivité du milieu. Par contre, si l'on ajoute un réducteur, comme l'acide ascorbique par exemple, il est possible d'obtenir une fixation nettement plus importante.

Voici les résultats donnés par l'une de nos meilleures expériences réalisées avec ce type d'apocoeruloplasmine : ils sont réalisés à partir d'une solution d'apocoeruloplasmine à 0,3 mg/ml contenant du cuivre 64 à la concentration de 0,03 µg/ml et de l'acide ascorbique à la concentration de 1,5 mg/ml.

Le mode opératoire reste le même que celui décrit dans les essais préliminaires, mais nous avons effectué la précipitation de la protéine, en fin de réaction, par addition de 3 ml de sulfate d'ammonium à saturation. On mesure ensuite la radioactivité sur 2 ml de surnageant et on calcule les pourcentages des radioactivités libre et liée.

TABLEAU III

Essais réalisés avec l'apocoeruloplasmine préparée selon la méthode de SCHEINBERG et MORELL.

Numéro des tubes	*Témoin*	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*
Concentration en cuivre en µg/ml de la gamme	0	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,6	0,8	1
Radioactivité de 2 ml de surnageant en c.p.m.	8990	5050	6170	6360	6720	7110	7350	7570	
% de radioactivité libre		56,1	64,5	68,5	70,8	74,8	79	81,8	84
% de radioactivité combinée		43,9	35,5	31,5	29,2	25,2	21	18,2	16
Rapport $\frac{\% \text{ R.libre}}{\% \text{ R.combinée}}$		1,28	1,82	2,17	2,42	2,96	3,76	4,49	5,2
Rapport $\frac{\% \text{ R.combinée}}{\% \text{ R.libre}}$		0,78	0,55	0,46	0,41	0,34	0,26	0,22	0,1

Comme , on peut le voir, (Tableau III), les résultats ne sont pas mauvais mais le pourcentage de fixation correspondant au blanc (tube N°1) est un peu faible (moins de 50 %). De plus, il s'agit là, rappelons-le, d'un cas favorable, nombre d'essais nous ont donné des valeurs pour le pourcentage de fixation correspondant au blanc, ne dépassant guère 35 %. Nous avons en effet, dans cette phase de notre recherche, tenté d'obtenir une protéine ayant le plus grand nombre de sites porteurs libres possible, c'est-à-dire, susceptible de donner un pourcentage de radioactivité liée correspondant au "blanc" élevé, donc un Ro bas. Cela évidemment diminue la sensibilité mais d'un autre côté ayant une protéine fortement réactive, il sera toujours temps de diminuer ensuite la concentration de manière à augmenter cette sensibilité ainsi que nous le verrons, dans le paragraphe relatif à l'influence de la concentration en protéine, sur le dosage. De plus, à la concentration en protéine que nous avons utilisée le plus souvent pour la mise au point de la méthode, à savoir 0,3 mg/ml, les courbes obtenues avec des pourcentages de radioactivité liée pour le blanc, élevés, sont en général bien meilleures que lorsque ces pourcentages sont faibles et en pratique, nous avons recherché un pourcentage de fixation du blanc, au moins égal à 50 % . C'est pourquoi, nous avons essayé de préparer notre apocoeruloplasmine d'une autre manière.

B- Deuxième méthode

MORELL et SCHEINBERG (101) préconisent une variante de la technique décrite, qui leur donnerait de meilleurs résultats. Cette variante consiste essentiellement à combiner le cuivre libéré de la coeruloplasmine, à du diethyldithiocarbamate. Il se forme alors, un composé colloïdal qui peut être séparé par ultracentrifugation à 40 000 tours/minute pendant 3 heures. BROMAN (17) qui a utilisé cette même technique pour préparer de l'apocoeruloplasmine en assez grande quantité, s'en montre satisfait. KASPER et DEUTSCH (75) par contre, estiment que le produit obtenu par cette méthode est assez nettement dénaturé. Pour notre part, ne disposant pas d'ultra-centrifugeuse, nous n'avons pu essayer cette technique.

Nous nous sommes alors tournés vers la préparation d'une apocoeruloplasmine, dans laquelle on utilise

pour enlever le cuivre de la coeruloplasmine, l'action des cyanures . KASPER et DEUTSCH (75) utilisent le NaCN pour préparer ce qu'ils appellent une "cyanoapocoeruloplasmine" pour la différencier d'apocoeruloplasmines préparées différemment. Malheureusement ils ne donnent pratiquement aucun détail sur leur procédé de préparation. Aussi avons-nous essayé la technique suivante :

Nous avons dissous 20 mg de coeruloplasmine dans 15 ml d'eau bidistillée et nous avons ajouté à cette solution 30 mg de KCN . Après contact pendant 10 heures au réfrigérateur, nous avons procédé à la séparation de la protéine, du cyanure de cuivre formé et de l'excès de KCN, par dialyse dans du boyau Nojax n° 23, dans l'eau courante pendant 12 heures.

Une réaction de compétition réalisée dans les mêmes conditions que précédemment, nous a donné les résultats suivants (Tableau IV) :

TABLEAU IV

Essais réalisés avec l'apocoeruloplasmine préparée par action des cyanures sur la coeruloplasmine

Numéro des tubes	*Témoin*	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*
Concentration cuivre en ml de la gamme	0	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,6	0,8	1
Oxydase en ml de réactif	11050	4900	5900	6490	7500	7350	8120	8450	8745
Pourcentage de cuivre libre		44,5	53,5	58,5	64	66,5	73,5	76,5	79,1
% de cuivre combiné		55,5	46,5	41,5	36	33,5	26,5	23,5	20,9 β
Rapport $\frac{\text{R. libre}}{\text{R. combinée}}$		0,80	1,15	1,41	1,78	1,98	2,77	3,25	3,78
Rapport $\frac{\text{R. combinée}}{\text{R. libre}}$		1,24	0,87	0,71	0,56	0,50	0,36	0,31	0,26 β

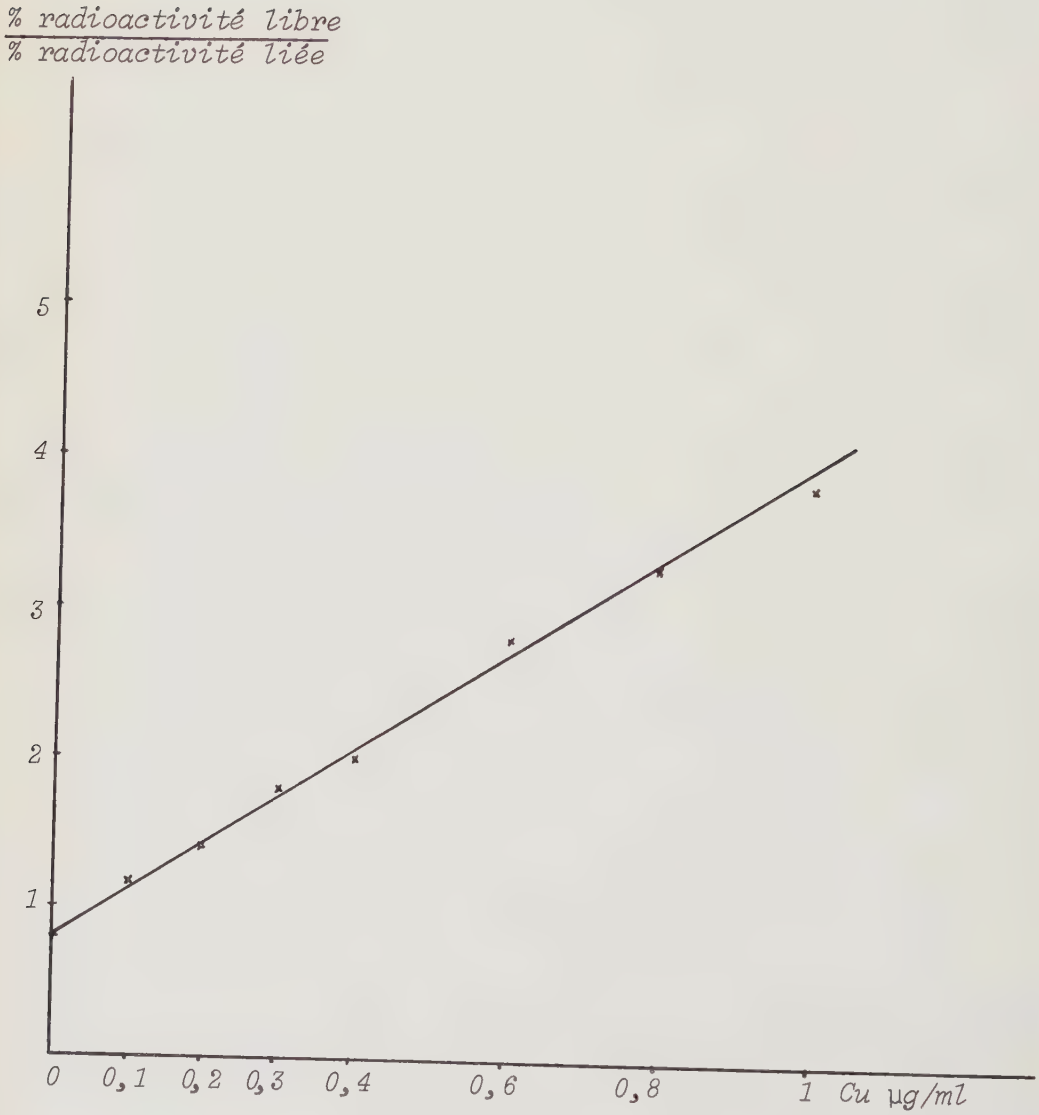

% radioactivité libre
% radioactivité liée
5
4
3
2
1
0
0,1
0,2
0,3
0,4
0,6
0,8
1 Cu µg/ml

Figure 2a

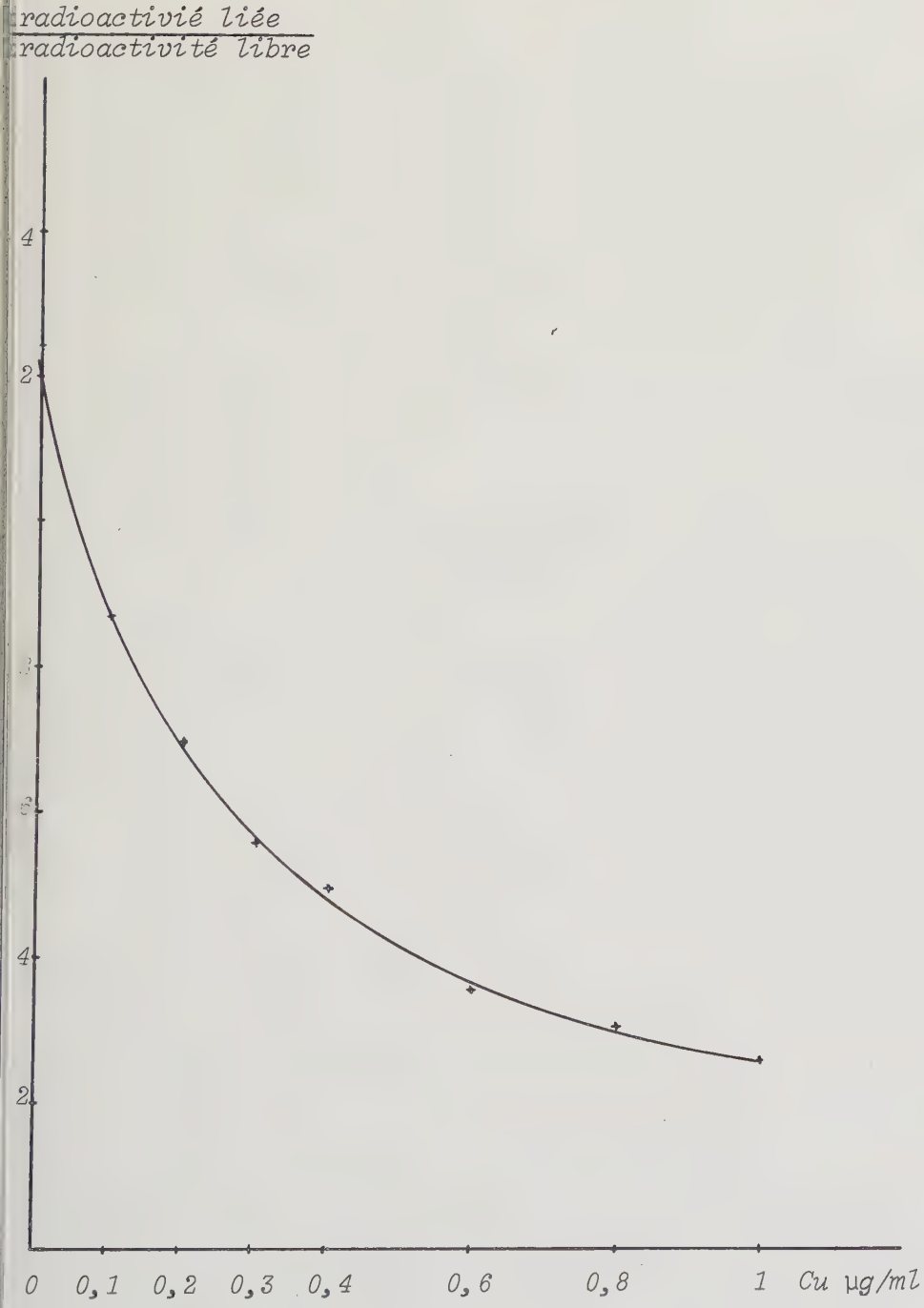

radioactivié liée
radioactivité libre
4
2
4
2
0
0,1
0,2
0,3
0,4
0,6
0,8
1
Cu µg/ml

Figure 2b

Par rapport à l'expérience réalisée avec l'apocoeruloplasmine obtenue par action de l'acide ascorbique, il faut noter une nette amélioration du pourcentage de la radioactivité fixée sur le blanc et une variation plus importante de ce pourcentage de radioactivité fixée, tout au long de la gamme de cuivre.

Des courbes représentatives de ces résultats, ont été tracées (figures 2) : rapport $\frac{\%\ R.libre}{\%\ R.\ liée}$, en fonction de la quantité de cuivre en µg/l : figure 2a et le rapport inverse $\frac{\%\ R.liée}{\%\ R.libre}$ en fonction de la même variable : figure 2b .

Nous en concluons que l'apocoeruloplasmine préparée par action des cyanures, donne de meilleurs résultats dans la réaction de compétition que celle préparée par action de l'acide ascorbique.

Nous avons alors recherché quelles étaient les conditions expérimentales les plus favorables pour préparer cette apocoeruloplasmine .

Plusieurs facteurs interviennent dans cette préparation en particulier :

- Rapport des concentrations protéine-KCN
- Temps de contact KCN - protéine
- Modalité de la séparation de l'acoeruloplasmine.

Rapport des concentrations protéine-KCN

Nous avons généralement travaillé sur des solutions de coeruloplasmine dont la concentration variait de 0,1 à 0,2 %, soit, 10 à 20 mg de coeruloplasmine dans 10 ml d'eau.

La quantité de KCN que l'on doit ajouter n'est pas indifférente, si l'on admet que la concentration en cuivre de la coeruloplasmine est de 0,32 %, la quantité théorique de KCN à ajouter pour transformer tout le cuivre contenu dans ces 10 à 20 mg de coeruloplasmine en cyanure de cuivre, est nettement inférieure à 1 mg, ce qui correspond à une solution de KCN à 0,01 % . Or, en réalité, pour obtenir un bon résultat, il faut des concentrations 20 à

40 fois supérieures en KCN. C'est pourquoi nous avons réalisé une série d'expériences au cours desquelles, nous avons ajouté à des échantillons de 10 mg de coeruloplasmine dissouts dans 10 ml d'eau, 1 - 5 - 10 - 20 - 40 - 80 - 160 mg de KCN. Chaque exéprience a été réalisée en double. Après 12 Heures de contact au réfrigérateur, les solutions ont été dialysées en eau courante pendant 16 heures dans du boyau Nojax n°23 . Au bout de ce temps, la recherche des cyanures dans le dialyseur est négative.

Des réactions de compétition ont été alors réalisées avec la solution contenue dans le dialyseur, selon la technique déjà décrite : dilution de la solution de protéine de manière à obtenir une concentration finale en protéine de 0,3 mg/ml . Addition à cette solution de 0,025 µg/ml de cuivre 64 et de 2 mg/ml d'acide ascorbique. Introduction de 2 ml de cette solution dans des tubes à centrifuger contenant déjà 1 ml d'une dilution de cuivre variant de 0 à 1 µg/ml. Séparation des fractions libres et liées par le sulfate d'ammonium à saturation et centrifugation.

Nous ne donnerons que les résultats correspondant au " blanc ".

Voici la moyenne des résultats obtenus (Tableau V_a).

TABLEAU V_a

Influence du rapport des concentrations protéine-KCN

Concentration initiale de KCN en mg.	*1*	*5*	*10*	*20*	*40*	*80*	*160*
adioactivité de 2ml du tube témoin en c.p.m.	13800	14020	13950	13640	13780	13920	14160
adioactivité de 2ml surnageant (radio-ctivité libre) du blanc" en c.p.m.	12380	11330	7170	4160	3430	4690	5870
de radioactivité iée à la protéine.	10,3	19,2	48,6	69,4	75,1	66,3	58,5

Ils sont, nous le pensons, assez significatifs et mettent bien en évidence l'influence très importance de la concentration en cyanure.

On voit donc, que pour obtenir des résultats valables, la quantité de KCN ajoutée, doit être 2 à 4 fois supérieure à celle de la coeruloplasmine. Si cette quantité est plus petite, les résultats sont mauvais, mais il ne faut pas non plus que cette quantité soit trop forte car les résultats sont également moins bons, ceci étant dû peut-être à une dénaturation plus importante de la protéine. Des dosages du cuivre (1) restant sur l'apocoeruloplasmine, montrent en effet que l'on ne gagne que peu au-delà de la concentration en KCN correspondant à 40 mg. (Tableau V_b) .

TABLEAU Vb

Dosage du cuivre restant sur les apocoeruloplasmines préparées avec différentes concentrations de KCN.

Concentration initiale de KCN en mg	*5*	*20*	*40*	*160*
Quantité de cuivre restant sur 10 mg d'apocoeruloplasmine en µg	14,2	2,7	2,1	1,6

Compte-tenu du fait que pour 10 mg de coeruloplasmine de départ, on a trouvé précédemment dans les mêmes conditions 27,5 µg de cuivre, correspondant à 8 atomes de cuivre par molécule de coeruloplasmine, on peut, de même , calculer ici, que l'apocoeruloplasmine préparée avec 5 mg de KCN, contient plus de 4 atomes de cuivre, celle préparée avec 20 mg de KCN en contient 0,8, celle préparée avec 40 mg de KCN en contient 0,6 et enfin celle

(1) par la méthode à l'oxalyldihydrazide

préparée avec 160 mg de KCN en contient 0,45 seulement.

KASPER et DEUTSCH (75)annoncent pour leur apocoeruloplasmine préparée par action de NaCN, moins de 0,3 atomes de cuivre par molécule. Nos résultats sont donc, un peu moins bons.

Dans la pratique, ultérieurement, nous avons utilisé une quantité de KCN, environ , 3 fois supérieure à celle de la coeruloplasmine.

Temps de contact KCN-Protéine

Si la concentration en KCN, ainsi que nous venons de le voir est un facteur déterminant de la bonne réalisation d'une réaction de compétition, le temps de contact au réfrigérateur, entre ces deux substances, est également important.

En effet, il faut, un temps de contact minimum, que nous avons déterminé expérimentalement sur des échantillons de 10 mg de coeruloplasmine mis en contact, dans 10 ml d'eau, avec 30 mg de KCN.

Les échantillons, après des temps de contact différents pour chacun : 3 - 6 - 12 - 24 - et 48 heures, ont été soumis à la dialyse pendant 16 heures.

Puis, sur chaque échantillon, a été effectuée une réaction de compétition, dans les mêmes conditions que précédemment.

Nous ne donnons que les résultats relatifs au blanc, comme nous l'avons déjà fait, pour l'étude de la concentration en KCN. (Tableau VI)

TABLEAU VI

Temps de contact KCN-Protéine

Temps de contact coeruloplasmine/KCN en heures	*3*	*6*	*12*	*18*	*24*	*48*
Radioactivité de 2 ml du tube témoin en c.p.m.	15320	13110	9240	6750	4810	1380
Radioactivité de 2 ml de surnageant du blanc en c.p.m.	11530	7560	2750	2270	2060	815
% de radioactivité liée à la protéine	24,7	42,3	70,2	66,4	51,1	40,8

Nous voyons que le temps optimum de contact, semble être de 12 heures. Dans la pratique, des temps de contact de 10 à 18 heures nous ont donné de bons résultats.

Ceci met en évidence que l'action du cyanure, n'est pas immédiate, bien que la décoloration de la solution, soit très rapide (moins de 20 minutes), mais qu'il faut au contraire, un certain temps pour obtenir une bonne apocoeruloplasmine.

Les temps de contact trop prolongés, donnent de moins bons résultats, sans doute à cause de l'augmentation de la dénaturation de la protéine.

Enfin, vient la dernière étape, avant d'aborder la réaction de compétition proprement dite, qui est, la séparation de l'apocoeruloplasmine des différents ions minéraux contenus dans la solution précédente.

Séparation de l'apocoeruloplasmine

Le premier procédé de séparation de la cyanoapocoeruloplasmine que nous avons utilisé est *la dialyse*. C'est le procédé que nous avons choisi finalement après en avoir essayé d'autres, comme nous le verrons, car malgré l'inconvénient qu'il a, d'être long, il nous a permis d'obtenir de bons résultats.

Cette dialyse a été effectuée dans du boyau Nojax n° 23.

La durée de cette dialyse, n'est pas indifférente. Il faut en effet un certain temps pour éliminer le cyanure de cuivre formé ainsi que le cyanure de potassium, et nous avons recherché expérimentalement le temps minimum de dialyse, compatible avec de bons résultats.

Dans ce but, 60 mg de coeruloplasmine, ont été mis en contact, 12 heures au réfrigérateur, avec 180 mg de KCN dans 60 ml d'eau.

Au bout de ce temps, des fractions de 10 ml de cette solution, ont été placées, dans des dialyseurs de boyau nojax n° 23, numérotés de 1 à 6, et mises à dialyser sous eau courante (débit de l'ordre de 0,5 litre/minute). La dialyse a été interrompue, au bout de temps différents pour chaque fraction :

3 - 6 - 12 - 18 - 24 et 48 heures.

Sur chaque dialysat, une recherche des CN (1) est faite et une réaction de compétion réalisée dans les mêmes conditions que précédemment.

Voici les résultats obtenus (Tableau VII)

(1) cette recherche est basée sur la réaction colorée fournie par le bromure de cyanogène avec la pyridine et la benzidine (137) .

TABLEAU VII

Séparation de l'apocoeruloplasmine par dialyse

Temps de dialyse en heures	*3*	*6*	*12*	*18*	*24*	*48*
Recherche des CN^-	++	±	-	-	-	-
Radioactivité de 2 ml du tube témoin en c.p.m.	19540	16730	17790	8620	6140	1735
Radioactivité de 2 ml de surnageant du blanc en c.p.m.	13620	9940	4470	2900	2170	755
% de radioactivité liée à la protéine	30,3	40,6	62,1	66,3	64,3	56,2

Ces résultats, montrent qu'une dialyse de plus de 6 heures est nécessaire . Il faut en pratique 12 à 18 heures. Un temps plus long, ainsi qu'on le voit n'apporte non seulement, rien de plus, mais au contraire diminue un peu la valeur du pourcentage de radioactivité liée à la protéine.

Notons en outre que dans le premier cas (3heures de dialyse), non seulement le pourcentage de radioactivité liée est faible, mais encore, la réaction de compétition proprement dite, ne marche pas, en ce sens que nous obtenons pratiquement le même pourcentage de fixation, quelle que soit la concentration en cuivre de la gamme (ceci n'est pas noté dans le tableau précédent).

Pour la dialyse de 6 heures, par contre, pourcentage de fixation et réaction de compétition, se développent à peu près normalement. On peut donc considérer ce temps, comme le temps minimum de dialyse compatible avec des résultats acceptables.

Mais en pratique, nous utilisons , un temps de dialyse d'au moins 10 heures.

Nous avons essayé d'autres procédés de séparation susceptibles d'être moins longs, et en premier lieu, *le système des résines*, préconisé dans la 1ère technique de préparation de l'apocoeruloplasmine, utilisant l'action de l'acide ascorbique.

Ce système, utilisé dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment, donne des résultats valables, moins bons, cependant que ceux donnés avec la dialyse. De plus la préparation des résines étant longue, ce procédé n'est pas en définitive plus avantageux.

Nous avons également essayé de réaliser cette séparation en utilisant les propriétés des *gels de dextran* et plus particulièrement celles du Séphadex G 15, pour lequel la limite d'exclusion correspond à des poids moléculaires de l'ordre de 1500.

Le séphadex G 15 est mis à gonfler dans de l'eau bipermutée pendant 3 heures, à la température ambiante. (ce temps peut être réduit à une heure, si le gonflement est réalisé au bain-marie à 100°).

On réalise une colonne de ce gel, de 1,5 cm de diamètre et de 28 cm de hauteur. La solution est passée sur la colonne. L'élution est réalisée avec de l'eau distillée et le débit est réglé à 1 ml/minute. L'éluat est recueilli par fractions de 1 ml, grâce à un collecteur de fractions. La partie protéique passe entre les 7è et 22è tubes. Mais la séparation n'est pas très nette car les cyanures sont déjà détectables dans le 21è tube. Malgré cela, en rejetant les derniers tubes de la partie protéique, qui sont d'ailleurs à faible concentration, on récupère 77 % des protéines de départ.

Les résultats obtenus ici, ne sont cependant pas meilleurs que ceux obtenus avec la dialyse et la conservation de la solution est moins bonne.

Enfin, un dernier procédé de séparation a été essayé. Il utilise *l'ultrafiltration* sur membranes Millipore Pellicon du type PSAC, qui ont un pouvoir d'arrêt de 1000.

Nous les avons utilisées montées dans une petite cellule de 2,5 cm de diamètre, en polycarbonates, pouvant contenir 12 à 15 ml de liquide et possédant un petit agitateur magnétique tournant au-dessus de la membrane. Nous avons travaillé avec une pression de 3 bars . Le débit, dans ces conditions est de l'ordre de 0,5 ml/ minute, mais diminue en fin d'expérience, quand le volume dans la cellule n'est plus que de 2 à 3 ml, malgré l'agitation. L'ultrafiltration doit être arrêtée, alors qu'il ne reste que 0,5 à 1 ml dans la cellule.

L'apocoeruloplasmine, séparée de cette manière, ne nous a jamais donné de bons résultats. Il est possible que l'augmentation de concentration de la protéine réalisée au cours de l'ultrafiltration, en modifie la structure et diminue sa réactivité.

Finalement, après ces différents essais, c'est à la dialyse traditionnelle, malgré sa durée, que nous sommes revenus, car c'est elle qui nous a donné les meilleurs résultats et les plus constants. Comme, de plus, nous nous sommes le plus souvent arrangés à la réaliser de nuit, sa longueur ne nous a pas gênés.

Signalons enfin, que nous avons effectué des essais pour tamponner le milieu correspondant à la phase de contact protéine-KCN, de manière à réduire l'alcalinité. Mais ces essais ne nous ont pas donné de bons résultats.

En résumé donc, la préparation de l'apocoeruloplasmine, se fait à partir d'une solution de coeruloplasmine à 0,1 % environ dans l'eau et contenant 0,3 % de KCN. Après contact d'une douzaine d'heures au réfrigérateur, la solution est dialysée sous eau courante, pendant au moins 10 heures.

La solution ainsi obtenue doit être utilisée dans un délai assez court. Elle peut se conserver au réfrigérateur 24 heures au maximum. Au delà, une réaction de compétition ne donne plus de résultats interprétables, sans doute à cause de la dénaturation de la protéine.

ETUDE DE LA REACTION DE COMPETITION ELLE-MEME

Nous en arrivons maintenant à l'étude de la réaction de compétition elle-même. Nous avons déjà décrit sommairemment comment nous la réalisions, mais ici encore, un certain nombre de facteurs intervenant dans cette réaction ont dû être étudiés séparément, de manière à obtenir les meilleurs résultats possibles.

Parmi ceux-ci, signalons :

- la composition du milieu réactionnel, à l'exclusion de la protéine et du cuivre.
- les concentrations relatives de protéine, cuivre à doser et cuivre radioactif.
- certains facteurs physiques, comme le temps de la réaction, la température de la réaction, le volume de la réaction, la nature des récipients,
- la séparation des fractions libre et liée.

A- Composition du milieu réactionnel

Dans ce paragraphe, nous étudierons l'influence d'un certain nombre de facteurs, tels que :

- pH
- présence d'ions étrangers
- nature et concentration du réducteur.

Influence du pH

Cette étude est très importante, car le pH joue un rôle essentiel dans la liaison cuivre protéine.

Le mode de liaisons du cuivre à la coeruloplasmine a été étudié par plusieurs auteurs, notamment KASPER et DEUTSCH (75) , SCHEINBERG (126) et WILLIAMS (147). Bien que leurs résultats ne soient pas tout à fait concordants, il semble que le cuivre soit lié à des groupements tyrosine, lysine et histidine, mais peut-être aussi imidazole et cystéine. En faisant varier le pH, il semble possible de modifier l'ionisation de ces différents groupements et par conséquent leur affinité pour le cuivre, donc en principe de favoriser certains types de liaisons par rapport à d'autres.

Or, dans son étude théorique sur les méthodes de saturation EKINS (40), recommande pour augmenter la sensibilité, d'isoler, dans la mesure du possible, les sites porteurs, correspondant à des constantes d'affinité importantes, de ceux pour lesquels les constantes sont faibles. D'où l'importance du rôle du pH dans la sensibilité de la réaction.

Nous avons pu vérifier expérimentalement que notre apocoeruloplasmine possède effectivement des sites de fixation de nature différente et des constantes d'affinité également différentes. En effet, SCATCHARD (124) qui a étudié les liaisons protéine effecteur a démontré que, si l'on appelle ν, le nombre moyen de molécules d'effecteurs Q fixés par la molécule d'une protéine P, comportant n sites de fixation, si (Q) est la concentration en effecteurs libres dans la solution, la représentation de $\frac{\nu}{(Q)}$ en fonction de ν est une droite, si tous les sites sont identiques et indépendants. Par contre, quand les sites sont différents, tout en restant indépendants, la courbe représentative prend une allure hyperbolique.

Nous avons recherché quelle était l'allure de cette courbe, dans notre cas particulier. Nous nous sommes pour cela, inspirés des travaux de LECUREUIL (82) et nous avons étudié la fixation de la protéine pour des concentrations croissantes de cuivre. Nous avons réalisé une réaction similaire aux précédentes mais avec cependant une différence : la réaction n'est faite ici qu'avec du cuivre radioactif à concentration variable.

Dans des tubes à centrifuger nous introduisons donc 2 ml d'une solution d'apocoeruloplasmine à 0,2 mg/l contenant l'acide ascorbique et nous ajoutons 1 ml d'une gamme de cuivre radioactif préparée à partir de la solution de Cu64 de Saclay. L'expérience est faite en double de manière à avoir un tube dosage et un tube témoin. Le reste de la réaction se fait comme il a déjà été dit. Au moment de la réaction, le volume dans les tubes étant de 3 ml, il est facile, connaissant les quantités de protéine et de cuivre introduites, de calculer les concentrations moléculaires en protéine et encuivre . Après la réaction, lorsque l'on sépare les phases libre et liée, il est également facile, en mesurant les radioactivités de calculer la concentration en cuivre libre et par différence, celle en cuivre lié.

Si on pose : C_T = concentration moléculaire totale en cuivre

C_1 = concentration en cuivre libre (correspondant à (Q))

C_L = concentration en cuivre lié

C_P = concentration moléculaire en protéine.

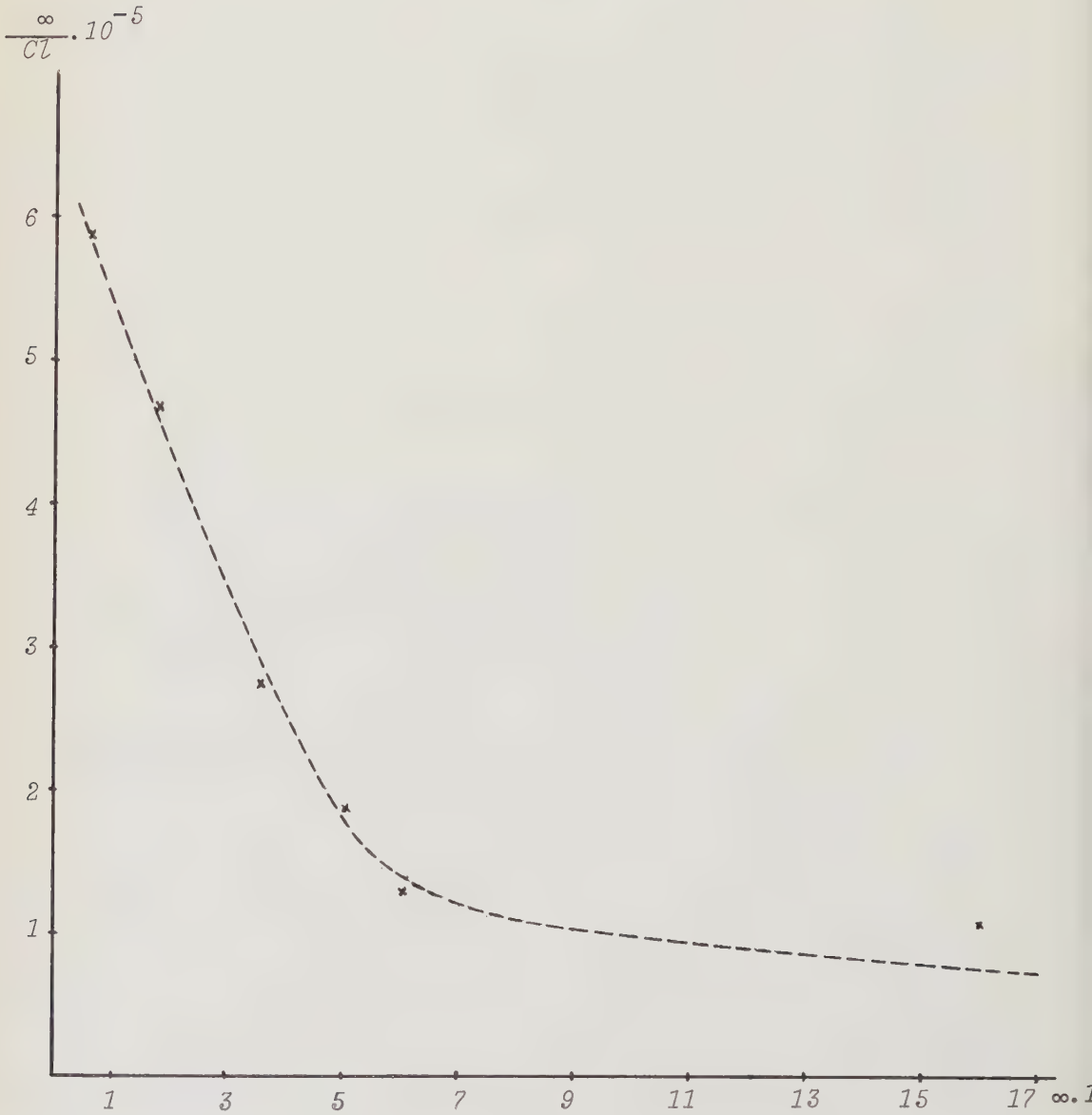
On aura : $\nu = \frac{C_T - C_1}{C_P}$

Il sera ensuite possible de calculer ν/C_1 et de tracer la courbe correspondante (figure 3)

TABLEAU VIII

Etude de la liaison apocoeruloplasmine-cuivre.

$C_T \times 10^9 M$	16	32	53	160	320	530	1600
Radioactivité de 2 ml de surnageant du tube témoin en c.p.m.	450	820	1310	4120	8140	14500	49500
Radioactivité de 2 ml du surnageant du tube dosage en c.p.m.	300	550	930	3310	7050	13350	45050
$C_1 \times 10^9 M$	10,6	22	37,6	129	275	477	1450
$\nu \times 10^2$	0,62	1,15	1,77	3,57	5,20	6,10	15,9
$\nu/C_1 \times 10^{-5}$	5,86	5,22	4,70	2,76	1,89	1,28	1,09



Etude de la liaison apocoeruloplasmine - cuivre

Figure 3

La courbe obtenue n'est pas très précise, car le nombre de points est insuffisant. Cependant, on peut facilement se rendre compte, qu'il ne s'agit pas d'une droite. La réaction fait donc bien intervenir au moins deux types de sites de nature différente. Il ne nous est pas possible de préciser la nature de ces sites, ni leur nombre, cette étude délicate dépassant le cadre du but que nous cherchons à atteindre, à savoir la mise au point d'une méthode de dosage du cuivre par compétition.

Pour étudier l'influence du pH sur la réaction nous avons réalisé des réactions de compétion, en milieu tamponné. 7 tampons ont été utilisés, de pH : 1,6 - 2,6 - 3,6 - 4,6 - 5,6 - 7 et 8, et les résultats comparés à ceux obtenus sans tamponner le milieu réactionnel.

Ces expériences ont été réalisées à partir d'une même solution d'apocoeruloplasmine . La concentration utilisée a été de 0,3 mg de protéine/ml. Cette solution contient 0,02 µg/ml de Cu64 et 2 mg/ml d'acide ascorbique. La réaction est effectuée dans les mêmes conditions que celles déjà décrites.

Réalisation des tampons :

pH 1,6 : solution A = KCL à 0,2 N
solution B = HCl à 0,2 N
tampon pH 1,6 (solution A ..... 25 ml
(solution B ..... 13,15 ml
(eau .. qs ..... 100 ml

pH 2,6 : Solution A : acide citrique, 1 H_2O 0,1 M
Solution B : phosphate disodique 2 H_2O 0,2 M

Tampon pH 2,6 (solution A ..... 89,1 ml
(solution B .....100 ml-89,1 ml

pH 3,6 : solution A = acide acétique 0,2 M
solution B = acétate de sodium, $3H_2O$ 0,2 M

Tampon pH 3,6 (solution A ..... 46,3 ml
(solution B ..... 3,7 ml
(eau ..... q.s.....100 ml

pH 4,6 : Solution A précédente
Solution B précédente

Tampon pH 4,6 (solution A ..... 25,5 ml
(solution B ..... 24,5 ml
(eau .....q.s..... 100 ml

pH 5,6 : Solution A précédente
Solution B précédente

Tampon pH 5,6 (solution A ..... 4,8 ml
(solution B ..... 45,2 ml
(eau .....q.s..... 100 ml

pH 7 : Solution A : phosphate monopotassique M/15
Solution B : phosphate dissodique, 12 H_2O M/15

Tampon pH7 (solution A ..... 39,2 ml
(solution B .....100 ml-39,2 ml

pH 8 : Solution A précédente
Solution B précédente

Tampon pH8 (solution A ..... 5,5 ml
(solution B ..... 100 - 5,5 ml

Tous ces tampons sont bien entendu vérifiés au pH mètre. Ils sont tous exacts, sauf le tampon pH 5,6 qui fait pratiquement 5,7 . Par ailleurs la solution non tamponnée à un pH initial de 3,8 .

Voici les résultats que nous avons obtenus, réunis dans le tableau suivant (tableau IX) et rapportés sur la figure 4 .

Remarques :

a représente : la radioactivité de 2 ml de surnageant en c.p.m.
b représente le pourcentage de radioactivité libre
c représente le pourcentage de radioactivité liée
d représente le rapport % radioactivité libre / % radioactivité liée.

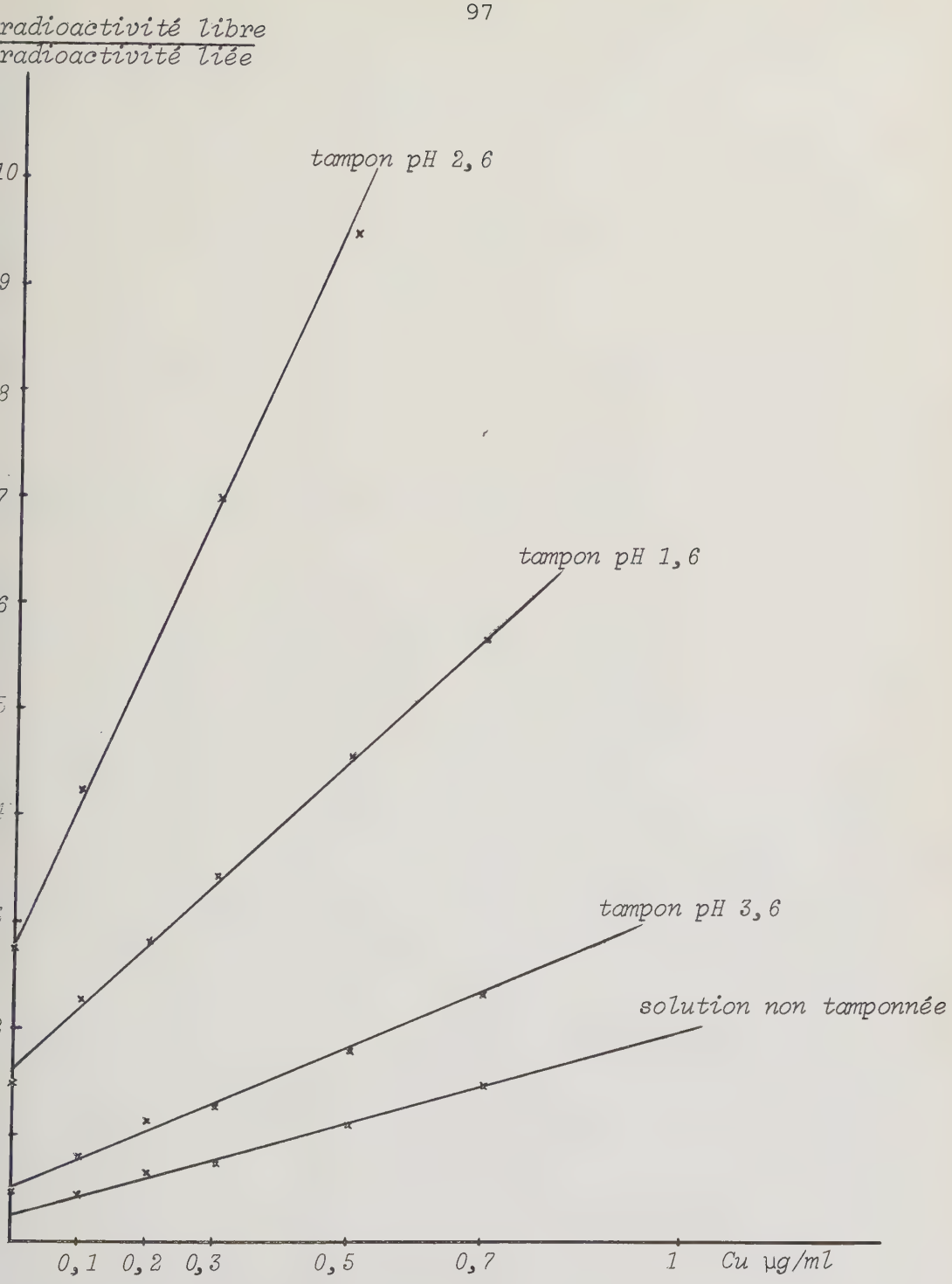

radioactivité libre / radioactivité liée
tampon pH 2,6
tampon pH 1,6
tampon pH 3,6
solution non tamponnée
0,1
0,2
0,3
0,5
0,7
1
Cu µg/ml

Figure 4

TABLEAU IX : *Influence de solutions tampons de pH différents sur la réaction de compétition*

	Concentration de la gamme de cuivre en µg/ml	*Témoin 0*	*0*	*0,1*	*0,2*	*0,3*	*0,5*	*0,7*
Série non tamponnée pH 3,8	a	3220	750	1020	1300	1410	1690	1920
	b		23,2	31,6	40,3	43,4	52,5	59,6
	c		76,8	68,4	59,7	56,6	47,5	40,4
	d		0,3	0,46	0,67	0,76	1,10	1,47
Série tamponnée pH 1,6	a	3460	2080	2400	2550	2680	2830	2940
	b		60,1	69,4	73,6	77,6	82	85
	c		39,9	30,6	26,4	22,4	18	15
	d		1,50	2,26	2,80	3,45	4,55	5,66
Série tamponnée pH 2,6	a	3030	2230	2450	2570	2650	2740	2790
	b		73,6	81	84,9	87,6	90,5	92
	c		26,4	19	15,1	12,4	9,5	8
	d		2,78	4,25	5,60	7	9,5	11,5
Série tamponnée pH 3,6	a	3720	1190	1670	1990	2080	2400	2600
	b		31,9	45	53,3	55,9	64,5	69,8
	c		68,1	55	46,7	44,1	35,5	30,2

tamponnée pH 4,6	b		38,2	40,3	43,2	42,2	46,4	48,2
	c		61,8	59,7	56,8	57,8	53,6	51,8
	d		0,61	0,67	0,76	0,73	0,86	0,93
Série tamponnée pH 5,6	a	1430	1320	1360	1360	1380	1460	1490
	b		54,3	56	56,8	56,8	60,3	61,3
	c		45,7	44	43,2	43,2	39,7	38,7
	d		1,19	1,27	1,31	1,31	1,52	1,58
Série tamponnée pH 7	a	2640	1370	1370	1390	1400	1410	1440
	b		51,9	51,9	52,7	53,1	53,4	54,6
	c		48,1	48,1	47,3	46,9	46,6	45,4
	d		1,08	1,08	1,11	1,13	1,14	1,20
Série tamponnée pH 8	a	2950	1970	1980	2020	1940	1990	1960
	b		66,8	67	68,5	65,9	67,4	66,6
	c		33,2	33	31,5	34,1	32,6	33,4
	d		2,01	2,03	2,17	1,93	2,06	1,99

Les résultats obtenus sont intéressants et mettent bien en évidence la grande importance du pH. On peut voir que pour les pH supérieurs à pH 4,6, la réaction de compétition ne se développe pas normalement. En effet, le pourcentage de radioactivite liée y est plus faible que dans la série non tamponnée qui sert en quelque sorte de référence. En outre, ce pourcentage est pratiquement indépendant de la concentration en cuivre du milieu, ce qui exclut toute possibilité de dosage.

On peut essayer d'expliquer ce phénomène, en considérant soit que la protéine est instable à ces pH et pratiquement dénaturée, soit que l'acide ascorbique ne joue plus son rôle de réducteur, ce qui est vraissemblable pour les pH 7 et 8, car on sait que l'acide ascorbique est rapidement détruit aux pH même faiblement alcalins. Il est possible, encore, qu'une partie du cuivre ne se trouve plus à l'état ionique.

Pour les séries tamponnées aux autres pH, on peut voir que les résultats sont meilleurs que ceux de la série non tamponnée, malgré un pourcentage de radioactivité liée, plus faible. En effet, les pentes des courbes obtenues sont nettement plus grandes, par conséquent la sensibilité est ici, nettement améliorée. Le phénomène est particulièrement net pour la série pH 2,6, où malgré un pourcentage de fixation très faible (moins de 27 % pour le blanc), la pente de la courbe est telle que l'on peut espérer, apprécier le 1/100 de µg de cuivre.

La série pH 1,6 donne déjà des résultats moins bons : le pourcentage de radioactivité liée est plus grand, mais la pente de la courbe est moins élevée.

Quant à la série pH 3,6 , les résultats sont à peine meilleurs que ceux de la série non tamponnée.

Il semblerait donc, qu'en diminuant le pH, l'on modifie l'ionisation de la protéine ou sa conformation de telle sorte que le nombre de sites porteurs diminue, ce qui se traduit par une diminution du pourcentage de radioactivité liée. Mais les sites inhibés, seraient ceux correspondant à une faible constante d'association, il ne resterait que les sites à constante d'association élevée, ce qui expliquerait l'augmentation de la pente des droites obtenues . Dans notre expérimentation, ce phénomène passe par un maximum à pH 2,6 et diminue en-deça et au-delà.

On pourrait aussi supposer, qu'une partie bien définie de la protéine est dénaturée, ce qui conduirait artificiellement à une diminution de la concentration en protéine active dans le milieu, phénomène qui s'accompagne lui aussi d'une diminution du pourcentage de la radioactivité liée et d'une augmentation de la sensibilité. En effet, nous verrons ultérieurement que cette dilution de la protéine conduit à des courbes du même genre. Mais cela nous semble peu probable, car ces courbes sont parfaitement reproductibles.

Signalons enfin, que dans cette étude de l'influence du pH, il se peut que la composition des différents tampons ait aussi une certaine importance.

Notons pour terminer, qu'aux pH inférieurs à pH 1, la réaction n'est plus possible, soit par destruction de la protéine, soit aussi par le fait qu'à ce pH le cuivre ne réagit plus avec elle.

L'action du pH est donc très nette, et soulève des problèmes qui mériteraient d'être étudiés de plus près.

Influence des ions étrangers à la réaction

Dans ce paragraphe, nous étudierons l'action que peuvent avoir sur l'évolution de la réaction, un certain nombre d'ions . En effet DEUTSCH (34), notamment, en étudiant la stabilité de la coeruloplasmine, trouve que les phosphates, bicarbonates,barbiturates, ammonium sulfates et les amino-acides diminuent la stabilité de la protéine alors que les chlorures, acétates, tétraborates et les sels de sodium l'augmentent.

Pour notre part, nous avons simplement recherché si la présence de NaCl à diverses concentrations pouvait améliorer la réaction de compétition.

Nous nous sommes, également , attachés à étudier les interférences possibles de certains ions avec le cuivre, dans la réaction de compétition. Ce problème est important, car il a trait à la spécificité de la réaction. Là encore nous avons limité notre étude à trois ions : zinc, fer, nickel : le zinc, parce qu'il est présent dans le

sérum, à peu près, à la même concentration que le cuivre et parce qu'il a des dimensions et une masse atomique très voisins de celles du cuivre et qu'il interfère souvent avec le cuivre dans les dosages chimiques ; le fer, lui aussi présent dans le sérum, a été retenu parce qu'il est transporté dans le plasma par la sidérophiline, et que cette protéine est susceptible également de fixer le cuivre, et nous nous sommes demandés si à l'inverse, l'apocoeruloplasmine ne serait pas capable de réagir avec le fer ; le nickel, enfin, car ce métal est souvent utilisé pour préparer du cuivre radioactif (1).

. Influence de NaCl

Comme au cours de notre étude sur le pH, cette influence a été mise en évidence en comparant les résultats de réactions de compétition donnés par des séries comprenant du NaCl à celui d'une série n'en contenant pas, prise comme référence. Dans toutes ces séries, il y a eu la même apocoeruloplasmine, les concentrations en cuivre radioactif et en acide ascorbique ont été les mêmes ; à savoir, 0,3 mg/ml pour la protéine, 0,018 µg/ml pour le cuivre radioactif et 2 mg/ml pour l'acide ascorbique . Les dilutions ont été faites, soit avec de l'eau bipermutée, soit avec des solutions de NaCl à 9-18 ou 36 %. Le reste de la méthode est celui déjà décrit antérieurement.

Voici les résultats (Tableau X).

(1) cf le paragraphe sur les isotopes radioactifs du cuivre .

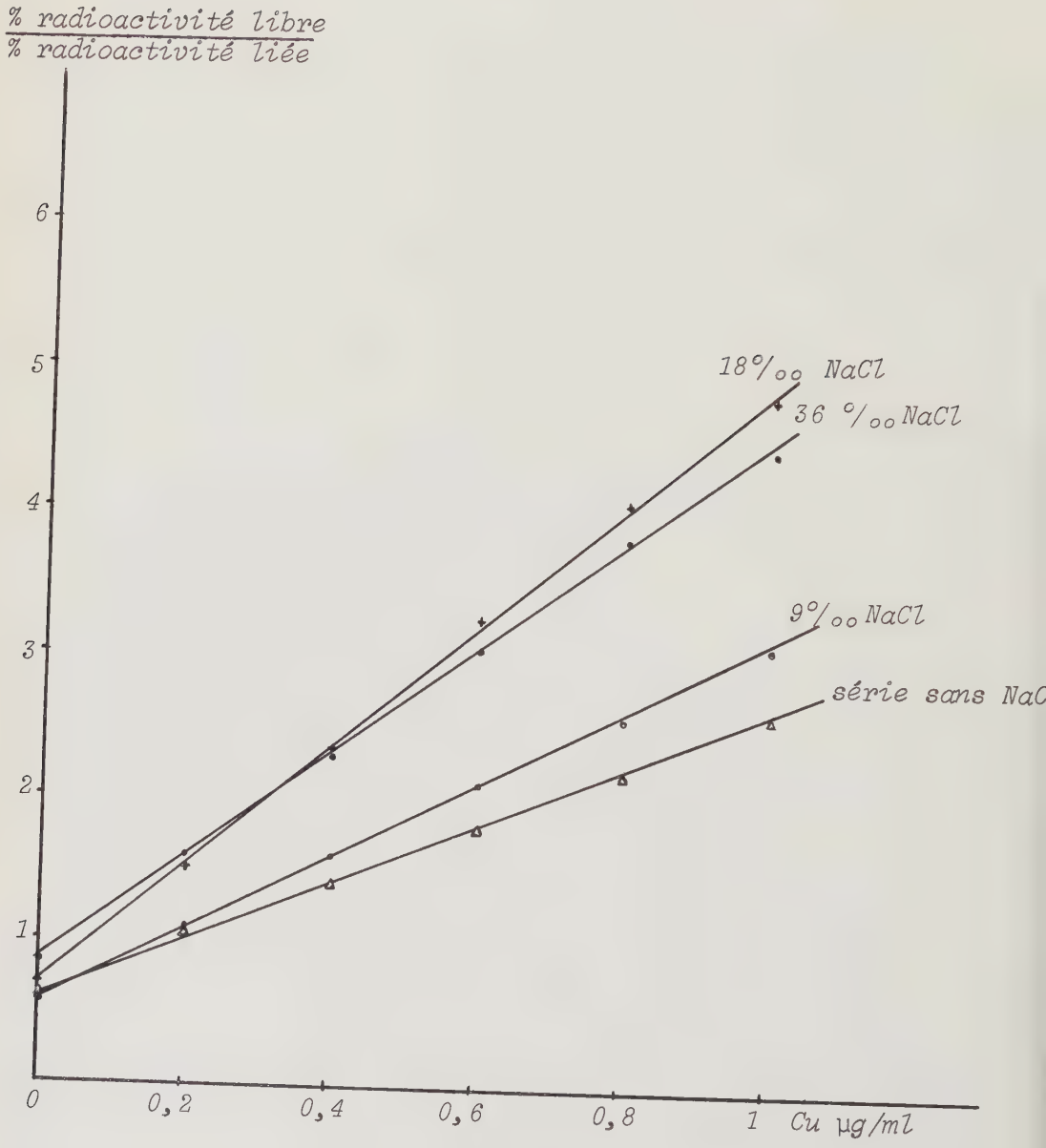
TABLEAU X

Influence de NaCl

	Concentration de la gamme de cuivre en µg/ml	Témoin	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
	a	3380	1230	1750	1970	2170	2320	2440
	b		36,3	51,7	58,3	64,2	68,7	72,2
	c		63,7	48,3	41,7	35,8	31,3	27,8
	d		0,57	1,07	1,40	1,80	2,20	2,60
	a	2640	940	1390	1620	1820	1900	1990
	b		35,6	52,6	61,5	68	71,8	75,3
	c		64,4	47,4	38,5	32	28,2	24,7
	d		0,55	1,11	1,60	2,12	2,55	3,05
	a	1720	710	1030	1210	1310	1380	1425
	b		41,1	60	70,1	76,4	80,2	82,8
	c		58,9	40	29,9	23,6	19,8	17,2
	d		0,70	1,50	2,35	3,25	4,05	4,81
	a	3380	1550	2080	2360	2550	2680	2760
	b		45,9	61,5	69,5	75,3	79,2	81,6
	c		54,1	38,5	30,5	24,7	20,8	18,4
	d		0,85	1,60	2,28	3,05	3,80	4,43

Avec, comme dans le tableau précédent :

a = radioactivité de 2 ml de surnageant en c.p.m.
b = pourcentage de radioactivité libre
c = " " " liée
d = rapport % radioactivité libre / % radioactivité liée.



Influence de la concentration en NaCl

Figure 5

Ces résultats mettent en évidence l'action favorable de NaCl. Ils sont en effet meilleurs dans les séries avec NaCl et principalement dans la série NaCl à 18‰ que dans la série sans NaCl. Cela se traduit par une augmentation de la pente des courbes représentatives (figure 5) et par une plus grande sensibilité des dosages . Toutefois, l'action de NaCl, reste beaucoup moins marquée que celle du pH.

. Influence des ions Zn^{2+}, Fe^{2+} et Ni^{2+}

Pour cette étude, nous avons réalisé 4 séries de dosage. Dans toutes les séries, nous sommes partis de la même solution d'apocoeruloplasmine à 0,3 mg/ml contenant 0,02 µg/ml de cuivre radioactif et 2 mg/ml d'acide ascorbique. Nous y avons introduit la gamme de cuivre allant de 0,1 à 1 µg/ml. Puis dans 3 de ces 4 séries nous avons ajouté, dans l'une 1 µg/ml de zinc, dans la 2ème 1 µg/ml de fer, et dans la 3ème 1 µg/ml de nickel.

Les 4 réactions étant conduites de la même manière, nous avons constaté que, aux erreurs de comptage près, les résultats étaient identiques dans les 4 séries. Ceci tend à prouver la spécificité de la protéine, spécificité due sans doute à sa conformation particulière.

Parallèlement à cette expérience, nous avons incubé de l'apocoeruloplasmine avec des isotopes radioactifs du fer et du zinc (Fe59 et Zn65), en présence d'acide ascorbique. Le pourcentage de radioactivité fixée, reste inférieur à 2 % .

On peut donc dire que, dans nos conditions expérimentales, les ions Zn^{2+}, Fe^{2+} , et Ni^{2+} n'interfèrent pas. On ne peut évidemment pas en déduire que la spécificité est totale , il faudrait pour cela tester les différents ions les uns après les autres, mais dans les cas de dosages de produits biologiques, nous pensons qu'il n'y a pas d'interférences à craindre.

Nature et concentration du réducteur.

Nous avons vu précédemment, que, pour obtenir une fixation importante du cuivre sur l'apocoeruloplasmine, celui-ci doit se trouver à l'état Cu^{+}. A l'état Cu^{++}, en effet, la fixation est très faible, elle augmente un peu par acidification mais ne dépasse jamais 5 %. KASPER et DEUTSCH (75) pourtant, prétendent que le cuivre fixé à la coeruloplasmine existe sous les 2 états Cu^{+} et Cu^{2+} sans cependant donner de chiffres.

La réduction de Cu^{2+} en Cu^{+} est assez facile, car le potentiel normal du système :

$$Cu^{++} + e \rightleftharpoons Cu^{+}$$

est égal à 0,45 à pH O.

Nous avons essayé, outre l'acide ascorbique, les réducteurs suivants : l'acide oxalique, le bisulfite de sodium, et le thiosulfate de sodium. Tous ces réducteurs donnent des résultats valables mais plutôt moins bons que ceux obtenus avec l'acide ascorbique. C'est pourquoi, nous sommes revenus à ce composé qui est d'ailleurs le réducteur le plus utilisé par les auteurs ayant étudié les problèmes de liaison cuivre-coeruloplasmine.

Nous avons dès lors, essayé de préciser la concentration optima en acide ascorbique de la solution :

Dans ce but, à partir d'une même solution d'apocoeruloplasmine à 0,3 mg/ml contenant 0,02 µg/ml de cuivre 64, nous avons réalisé 4 séries de dosages, correspondant à des concentrations différentes en acide ascorbique à savoir : 0,70 - 3,5 - 14 - et 40 mg/ml. Dans tous les cas, la dissolution est bonne, les pH respectifs de départ des solutions, ont été mesurés.

Voici les résultats obtenus sur une gamme de cuivre allant de 0,1 à 1 µg/ml, la technique de réaction étant la même que précédemment (Tableau XI).

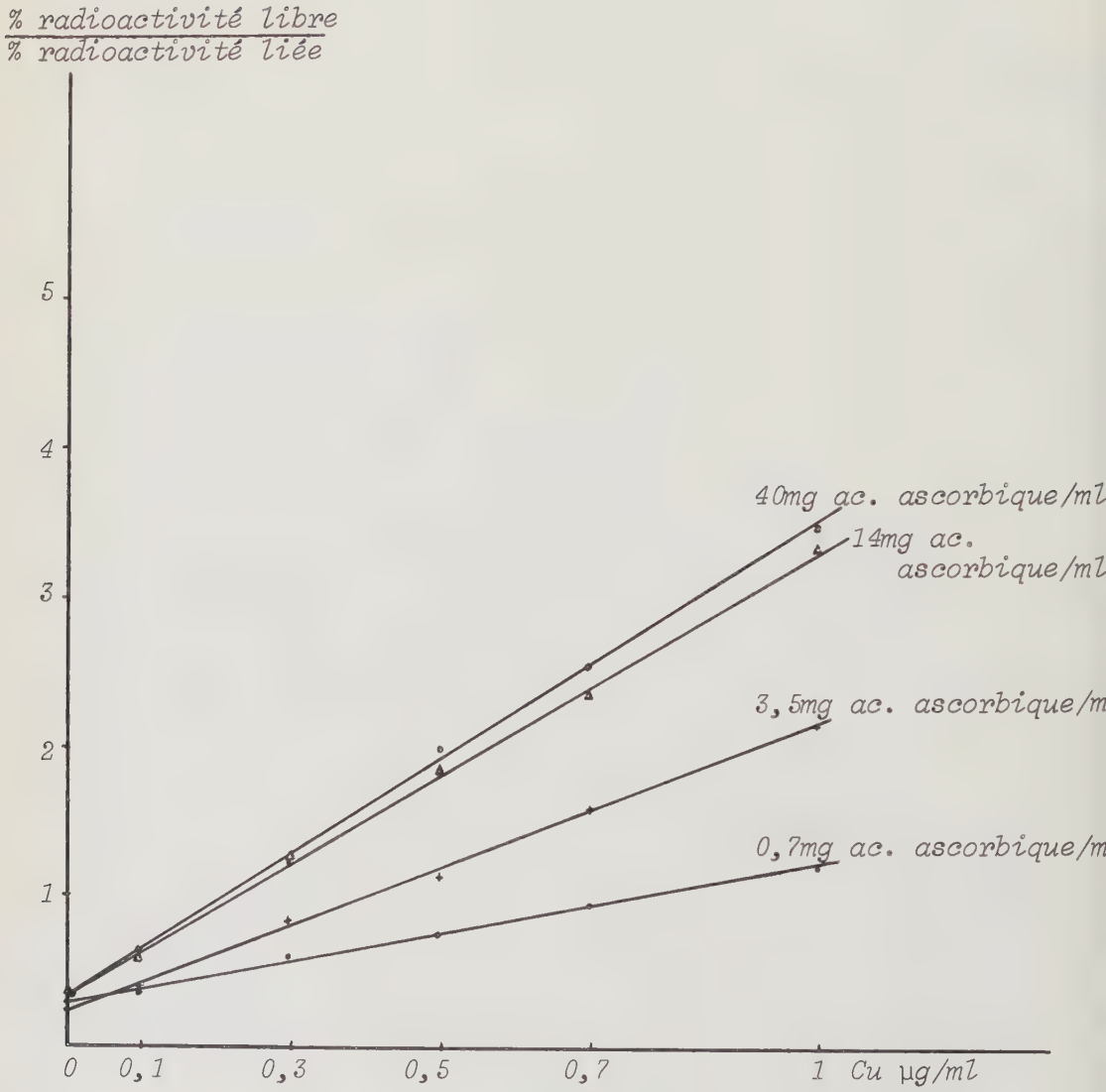
TABLEAU XI

Influence de la concentration en acide ascorbique.

Concentration de la gamme de cuivre en µg/ml		*Témoin 0*	*0*	*0,1*	*0,3*	*0,5*	*0,7*	*1*
e 0,7 mg/ml ide ascor- bique pH 5,3	a	8770	2 000	2 390	3 345	3 740	4 300	4 780
	b		22,8	27,2	38,1	42,6	48,9	59,5
	c		77,2	72,8	61,9	57,4	51,1	45,5
	d		0,29	0,37	0,61	0,74	0,95	1,20
e 3,5 mg/ml ide ascor- bique pH 3,6	a	10 940	2 090	3 280	5 070	5 860	6 730	7 470
	b		19,1	29,9	46,3	53,5	61,5	68,2
	c		80,9	70,1	53,7	46,5	38,5	31,8
	d		0,23	0,42	0,86	1,15	1,60	2,15
e 14 mg/ml ide ascor- bique pH 2,9	a	10 530	2 490	3 900	5 900	6 830	7 390	8 100
	b		23,6	37	56	65	70,2	76,9
	c		76,4	63	44	35	29,8	23,1
	d		0,31	0,59	1,27	1,85	2,35	3,33
e 40 mg/ml ide ascor- bique pH 2,6	a	10 570	2 900	4 120	5 930	7 040	7 600	8 200
	b		27,3	38,9	56	66,6	71,9	77,5
	c		72,7	61,1	44	33,4	28,1	22,5
	d		0,37	0,63	1,27	1,99	2,56	3,45

Ici comme précédemment

a = radioactivité de 2 ml de surnageant en c.p.m.
b = pourcentage de radioactivité libre
c = pourcentage de radioactivité liée
d = rapport % radioactivité libre / % radioactivité liée.



Influence de la concentration en acide ascorbique

Figure 6

Ainsi qu'on peut le voir sur les courbes représentatives le fait d'augmenter la concentration en acide ascorbique, augmente sensiblement la pente des droites, et par conséquent la sensibilité . Ceci est vrai au moins jusqu'à la concentration de 14 mg/ml, au-delà, il semble que l'on ne gagne rien de plus. (figure 6).

Par ailleurs, l'augmentation de la concentration en acide ascorbique, s'accompagne d'une diminution du pH . Or, nous avons vu précédemment, qu'une acidification à l'aide de solution tampon, accroit elle aussi la pente des courbes. Cependant, nous pensons qu'ici, le facteur essentiel de l'augmentation de la sensibilité vient de l'accroissement de la concentration du réducteur et non de l'acidification qui l'accompagne. En effet, dans une de nos expériences réalisées en milieu tamponné à pH 3,6 avec une concentration en acide ascorbique de 0,6 mg/ml, les résultats ont été mauvais.

L'augmentation de la concentration du réducteur déplace l'équilibre :

$$Cu^{++} + e^{-} \rightleftharpoons Cu^{+}$$

vers la droite. On a donc, dans le milieu, relativement plus de Cu^{+} . Si l'on admet que le cuivre ne peut se fixer que sous cette forme, il est normal que pour une même concentration en cuivre total, le pourcentage de cuivre radioactif fixé diminue, ce qui se traduit bien par une augmentation des pentes des courbes.

Cependant la concentration en acide ascorbique n'est pas critique, en effet à partir de 1,5 à 2 mg/ml, on obtient des résultats convenables et un excès n'est guère à redouter.

B - Concentrations relatives protéine, cuivre à doser et cuivre radioactif.

Nous en arrivons maintenant à un facteur important, qui est celui de la concentration en protéine porteuse, ou plutot du rapport entre la concentration en protéine proteuse et la quantité d'effecteur.

L'expérience montre en effet, qu'à partir d'une certaine concentration en protéine, on ne peut doser

valablement l'effecteur que pour des concentrations comprises entre des limites que l'on peut déterminer expérimentalement, car si la concentration en protéine est importante, les sites porteurs sont nombreux et le pourcentage de radioactivité liée correspondant au blanc, est nécessairement élevé. Dans ce cas, si on ajoute une très faible quantité d'effecteur non marqué, celle-ci ne déplacera qu'une très faible quantité d'effecteur radioactif lié. La variation de radioactivité sera donc négligeable et difficilement mesurable, de sorte qu'un dosage sera à peu près impossible et la réaction manquera de sensibilité. Ce ne sera qu'à partir d'une certaine concentration en effecteur que ce déplacement deviendra suffisamment important, pour qu'un dosage puisse se faire. On assistera peu à peu à une diminution de la radioactivité liée et à une augmentation consécutive de la radioactivité libre, étant donné que ce déplacement est proportionnel à la quantité de ligand ajoutée. Mais il va arriver un moment où les variations relatives de radioactivité vont redevenir faibles du fait que l'on approchera de la saturation de la protéine. La quantité de radioactivité liée sera faible, le dosage manquera à nouveau de sensibilité. Ceci apparait dans notre cas lorsque le pourcentage de radioactivité libre est voisin de 80 %. Si l'on diminue la concentration en protéine porteuse, le nombre de sites offerts diminuera et vis-à-vis d'une même quantité totale d'effecteur, la répartition entre les parties libre et liée sera différente.

Si l'on admet l'application de la loi d'action de masse, on doit donc s'attendre, lorsque p diminue à ce que (PQ^*) s'abaisse, et donc que (Q^*) augmente. Le rapport: $R = \frac{(Q^*)}{(PQ^*)}$ augmentera et ceci sera vrai, quelle que soit la concentration en effecteur, mais sera particulièrement visible pour le dosage correspondant au blanc, où l'on pourra voir sur nos résultats expérimentaux, que le pourcentage de radioactivité liée, passe de89,6 % quand p = 1 mg/ml à 32,8 % quand p = 0,1 mg/ml. Ro varie alors de 0,11 à 2,05 .

On peut démontrer théoriquement que les courbes obtenues lorsque la seule variable est la concentration initiale en protéine peuvent se déduire les unes des autres. Nous allons montrer d'une manière approchée certes, mais

simple, que l'on passe de la courbe correspondant à une concentration en protéine p_1 à celle correspondant à une concentration p_2, inférieure à p_1, en multipliant les ordonnées de la première par une constante supérieure à 1, qui dépend du rapport des concentrations. Il s'ensuivra que la pente de la courbe correspondant à p_2 sera supérieure à celle correspondant à p_1 dans le même rapport.

En partant, de l'équation représentative de la loi d'action de masse, appliquée au phénomène :

$$(P) \cdot (Q) = K\,(PQ)$$

On peut déduire que $R = \dfrac{(Q)}{(PQ)} = \dfrac{K}{(P)}$

Et du fait que $p = (P) + (PQ)$

$$R = \frac{K}{p - (PQ)}$$

Or dans la pratique, la concentration en effecteur est en général nettement plus faible que la concentration en protéine porteuse, c'est du moins notre cas, et on peut donc dire que $(PQ) << p$, et par conséquent négliger (PQ) devant p.

Pour une concentration enprotéine p_1 et pour une quantité totale d'effecteur donnée, on aura donc :

$$R_1 \simeq \frac{K}{p_1}$$

Pour une autre concentration en protéine p_2 et la même quantité totale d'effecteur, on aura de même :

$$R_2 \simeq \frac{K}{p_2}$$

d'où $\dfrac{R_2}{R_1} \simeq \dfrac{p_1}{p_2}$ si la constante de réaction n'a pas varié.

ou $R_2 \simeq \dfrac{p_1}{p_2} \; R_1$

et si $p_2 < p_1$ on a bien $R_2 > R_1$. Ceci est vrai pour chacun des points de la courbe. EKINS fait une étude beaucoup plus complète de cette question et démontre que $\frac{R2}{R_1}$ est proportionnel à $\frac{p_1}{p_2}$.

La dilution en protéine doit donc fournir dans notre cas des droites d'ordonnées de plus en plus élevées puisque R augmente mais aussi de pentes de plus en plus grandes, ce qui se traduira par une augmentation de la sensibilité.

Dans la pratique, si le phénomène apparait bien comme tel, dans l'ensemble le coefficient de proportionnalité entre les différentes courbes, n'est pas toujours le même, car le phénomène de dilution s'accompagne souvent d'une variation de la réactivité de la protéine et corrélativement d'une variation de la constante de réaction.

Expérimentalement, nous avons réalisé cette étude, en partant d'une même solution d'apocoeruloplasmine. Les dilutions choisies ont été : 0,1 - 0,2 - 0,3 - 0,5 et 1 mg de protéine par millilitre. La concentration en acide ascorbique est de 2,5 mg/ml de solution. Quant à la concentration en cuivre radioactif, elle a été dans toutes les séries de 0,145 µg par mg de protéine. La gamme étalon de cuivre a été élargie : 0,01 µg à 10 µg de cuivre/ml.

La technique de la réaction a été la même que celle déjà décrite et a été identique pour les 5 séries, sauf pour la série 0,1 mg de protéine/ml. Ici, avant la précipitation par le sulfate d'ammonium saturé, on a ajouté 1 goutte d'une solution de γ globuline, de manière à amener la concentration finale en protéine dans les tubes de dosage à 0,2 mg/ml. En effet, à cette dilution d'apocoeruloplasmine, la précipitation est difficile et conduit à des résultats peu reproductibles, du fait de la mauvaise séparation des fractions libres et liées. L'addition des γ globulines conduit à une meilleure précipitation sans modifier l'équilibre de la réaction . Nous avons pu vérifier, pour des concentrations plus importantes en apocoeruloplasmine que l'addition de γ-globulines ne modifie pas les résultats.

Voici les résultats obtenus, groupés dans le tableau XII et rapportés sur la figure 7 (les lettres a, b, c, d ont les mêmes significations que dans les tableaux précédents).

Ainsi qu'on peut le voir, pour les concentrations élevées en protéine porteuse (0,5 et 1 mg/ml), la sensibilité est mauvaise le seuil de détection du cuivre est de l'ordre du 1/10 µg, mais la zone de mesure est étendue (plusieurs µg).

Au contraire, pour les faibles concentrations en protéine porteuse, (et notamment 0,1 mg/ml), il est possible de détecter 1/100 de µg de cuivre,mais la zone de mesure se restreint beaucoup. Elle va dans ce cas de 0,01 à moins de 0,1 µg de cuivre/ml.

Il faut en outre remarquer sur les courbes obtenues, que la proportionnalité entre les concentrations en protéine et les pentes de ces droites, n'est pas respectée, sauf pour les concentrations de 0,5 et 1 mg/ml.

Signalons enfin, qu'à partir d'une certaine concentration de cuivre qui varie, évidemment, avec chaque dilution de protéine, la courbe représentative s'éloigne de la droite pour présenter une concavité dirigée vers le bas. Ce phénomène serait d'après EKINS (39), en relation avec l'existence de sites porteurs de réactivité différente et recoupe bien ce que nous avions signalé lors de l'étude de l'influence du pH sur la réaction de compétition.

La concentration de 0,1 mg/ml pour la protéine, semble cependant la plus faible concentration que l'on puisse utiliser. En effet, si on dilue encore la protéine, la réaction ne marche plus. Il est probable que la protéine est alors dénaturée et perd ses propriétés. L'addition de NaCl ou de γ-globulines n'apporte pas d'amélioration. Nous avons pensé également que des phénomènes d'absorption sur les parois de verre pouvaient intervenir. Nous avons donc travaillé également dans des récipients de plastique ou en verre siliconé. Mais les résultats ont été identiques. Il est donc très vraissemblable qu'il s'agisse d'un phénomène de dénaturation.

Il nous a cependant été possible d'accroitre encore la sensibilité de notre réaction en tamponnant le milieu. Nous avons vu en effet, lors de l'étude du pH ,

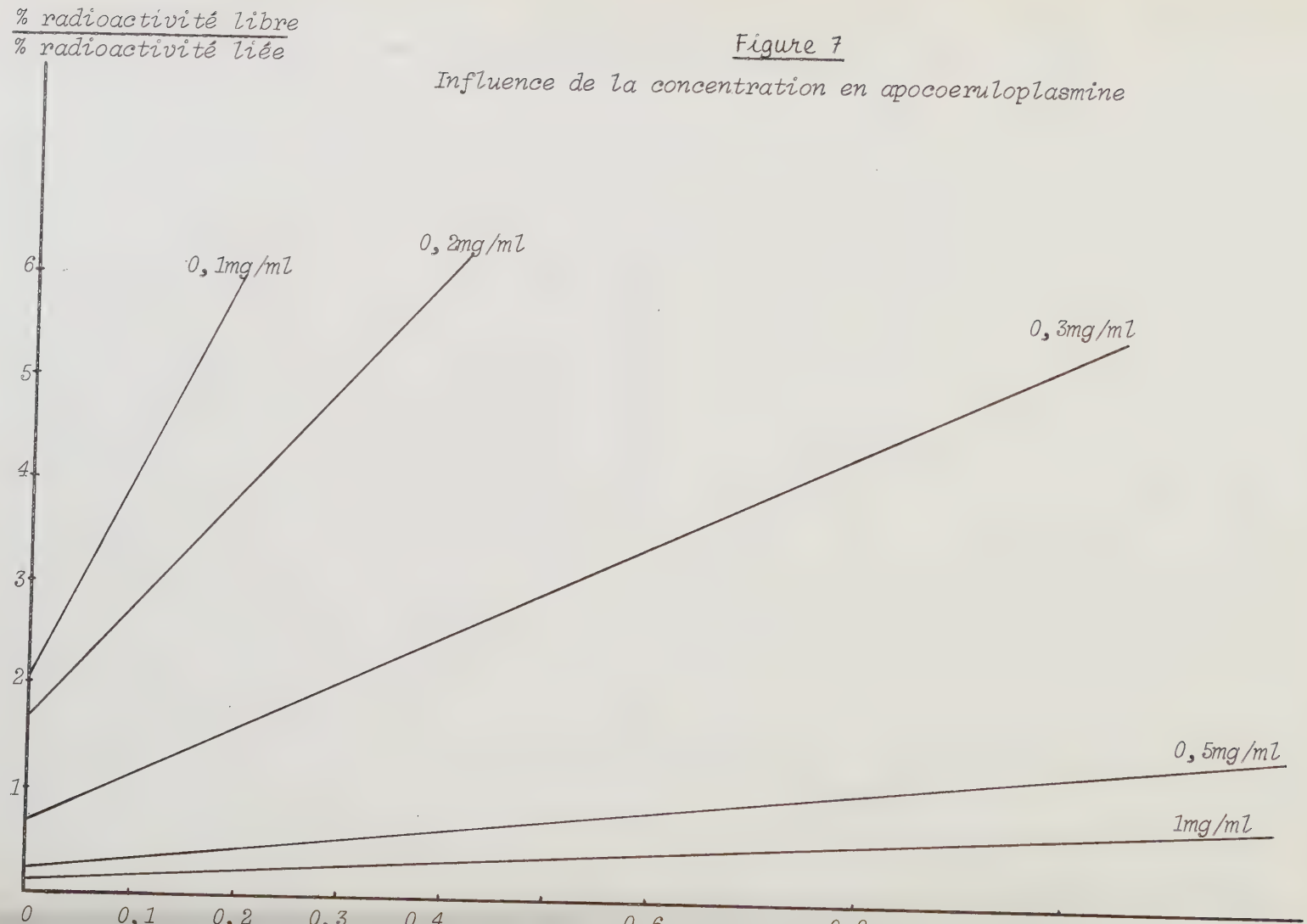
TABLEAU XII : *Influence des concentrations relatives protéine porteuse - cuivre à doser - cuivre radioactif*

Concentration de la gamme de cuivre en µg/ml		*Témoin 0*	*0*	*0,01*	*0,02*	*0,04*	*0,06*	*0,*
Solution d'apo-cœruloplasmine à 0,1 mg/ml	a	9 300	6 250	6 525	6 680	6 885	7 150	7 2
	b		67,2	70,1	71,8	74	76,9	78
	c		32,8	29,9	28,2	26	23,1	21
	d		2,05	2,35	2,55	2,85	3,33	3
Solution d'apo-cœruloplasmine à 0,2 mg/ml	a	11 700	7 350	7 445	7 520	7 935	8 155	8 3
	b		62,8	63,6	64,2	67,8	69,7	71
	c		37,2	36,4	35,8	32,2	30,3	28
	d		1,69	1,75	1,80	2,11	2,30	2,
Solution d'apo-cœruloplasmine à 0,3 mg/ml	a	13 650	5 600	5 850	6 065	6 310	6 540	7 0
	b		41	42,8	44,4	46,2	47,9	5
	c		59	57,2	55,6	53,8	52,1	4
	d		0,70	0,75	0,80	0,86	0,92	
Solution d'apo-cœruloplasmine à 0,5 mg/ml	a	11 300	2 030	1 885	2 035	2 115	2 470	2 7
	b		18	16,7	18,1	18,7	21,8	2
	c		82	83,3	81,9	81,3	78,2	7
	d		0,21	0,20	0,22	0,23	0,28	
Solution d'apo-cœruloplasmine à 1 mg/ml	a	12 830	1 335	1 330	1 165	1 375	1 340	1 4
	b		10,4	10,4	9,1	10,7	10,4	1
	c		89,6	89,6	90,9	89,3	89,6	8
	d		0,11	0,11	0,10	0,12	0,11	

1	0,2	0,4	0,6	0,8	1	3	6	10
40	7 880	8 380	8 450					
0	84,7	90,1	91					
0	15,3	9,9	9					
4	5,55	9,1	10					
60	9 250	9 735	10 000	10 730	10 815			
3	79	83,2	85,5	91,7	92,4			
7	21	16,8	14,5	8,3	7,6			
2,71	3,77	4,95	5,88	11,1	12,2			
0	8 315	9 700	10 600	11 080	11 400	12 710		
3,5	60,9	71	77,6	81,1	83,5	93,1		
6,5	39,1	29	22,4	18,9	16,5	6,9		
1,15	1,56	2,45	3,45	4,30	5,06	13,5		
30	3 610	4 575	5 190	5 790	6 250	8 670	9 710	10 290
,9	31,9	40,4	46	51,2	55,4	76,7	85,9	91,1
,1	68,1	59,6	54	48,8	44,6	23,3	14,1	8,9
35	0,47	0,68	0,85	1,05	1,24	3,30	6,1	10,2
0	2 400	3 110	3 925	4 280	5 185	8 080	9 910	10 840
,8	18,7	24,2	30,6	33,4	40,4	63	77,2	84,5
,2	81,3	75,8	69,4	66,6	59,6	37	22,8	15,5
16	0,23	0,32	0,44	0,50	0,67	1,70	3,40	5,45

Figure 7

Influence de la concentration en apocoeruloplasmine



qu'en opérant à pH 2,6, la sensibilité de la réaction est accrue . Nous avons donc réalisé une solution d'apocoeruloplasmine à 0,1 mg/ml dans le tampon pH 2,6 déjà décrit. La gamme de dilution de cuivre choisie va de 10^{-3} à 10^{-2} µg/ml. L'eau utilisée dans cette réaction est une eau bipermutée, redistillée sur quartz. La concentration en cuivre radioactif est de 3.10^{-3}µg/ml, celle de l'acide ascorbique de 5 mg/ml. La précipitation de la protéine est facilité par addition d'une goutte de γ-globuline, en fin de réaction, ainsi que nous l'avons déjà fait. Les comptages de radioactivité se font sur 2 ml toujours, mais cette fois pendant un temps de 4 minutes, de manière à accroitre la précision.

Voici les résultats obtenus, rapportés dans le tableau suivant (Tableau XIII) ,(les chiffres retenus constituent la moyenne de 3 mesures).

TABLEAU XIII

Réaction de compétition réalisée avec 0,1 mg/ml d'apocoeruloplasmine et en milieu tamponné PH 2,6 .

Concentration en cuivre de la gamme en µg/ml	*Témoin*	*0*	*10^{-3}*	*2.10^{-3}*	*3.10^{-3}*	*4.10^{-3}*	*5.10^{-3}*	*7.10^{-3}*	*10^{-2}*
Radioactivité de 2 ml de surnageant	12 650	10 330	10 440	10 500	10 570	10 640	10 705	10 820	10 880
% de radio-activité libre		81,6	82,3	83	83,5	84,1	84,6	85,5	86
% de radio-activité liée		18,4	17,7	17	16,5	15,9	15,4	14,5	14
$\frac{\%\ \text{Rad. libre}}{\%\ \text{radio. liée}}$		4,45	4,65	4,88	5,09	5,3	5,51	5,91	6,15

Ces résultats montrent que le 1/1000 de µg de cuivre est détectable mais les variations sont très faibles, et on arrive là, semble t-il, à la limite des possibilités de la méthode dans son état actuel.

Comparativement aux autres méthodes classiques de dosage, cette sensibilité est supérieure à celle donnée par n'importe quelle méthode chimique et au moins égale à celle que peut donner l'absorption atomique, avec un appareil très performant. Seule évidemment, la méthode par activation permet d'aller plus loin.

Nous venons donc de voir que la concentration en protéine a une influence très importante sur la sensibilité de la réaction et en outre que pour chaque concentration en protéine, correspond un intervalle de mesure pour le cuivre à doser.

Or, pour réaliser ces mesures, il faut ajouter au milieu réactionnel du cuivre radioactif, et l'on peut se demander si la quantité à ajouter doit être parfaitement définie. Si l'on admet que la loi d'action de masse est valable ici, on est ramené à un problème très voisin du précédent. Nous considérons cette fois la concentrationinitiale en protéine constante, et nous faisons varier la quantité d'effecteur . Pour une même quantité de protéine et une même gamme étalon de cuivre stable, si on diminue la quantité de traceur, on doit s'attendre à trouver des courbes différentes avec pour le blanc, un rapport $\frac{(Q^*)}{(PQ^*)}$, supérieur et une pente également supérieure.

C'est ce que nous avons pu vérifier expérimentalement sur une solution d'apocoeruloplasmine à 0,3 mg/ml et une gamme de cuivre allant de 0,1 à 1 µg/ml . Pour des concentrations en cuivre radioactif de $7{,}5\times10^{-3}$, 15×10^{-3}, 30×10^{-3} et 60×10^{-3} µg/ml, les pourcentages de radioactivité liéé, correspondant au blanc, valent respectivement 65 %, 68 %, 75,2 %, et 80,8 %. Les pentes des droites obtenues, ne sont cependant pas très différentes, ce qui est normal car la concentration en traceur n'intervient que d'une manière relative par rapport à la concentration totale en effecteur dont dépend l'équilibre.

Si l'on obtient donc, une augmentation de la radioactivité liée, avec l'accroissement de la concentration en traceur, ce qui pourrait sembler favorable, il est clair cependant qu'une concentration trop importante nuira à la sensibilité, car l'addition d'une très petite quantité d'effecteur non marqué provoquera un déplacement de l'équilibre, se traduisant par une variation faible de la radioactivité libre, qui risquera de passer inaperçue. Nous avons toutefois vérifié expérimentalement qu'une concentration de traceur supérieure à la concentration de l'effecteur que l'on veut doser permet malgré tout de faire le dosage.

La concentration en traceur n'est donc pas critique mais on doit en pratique l'ajuster à la concentration en protéine et à la gamme de dosage. Pour notre part nous avons travaillé avec des concentrations en cuivre radioactif de l'ordre de 0,02 µg/ml ou même moins.

C - *Etude de certains facteurs physiques*

Nous avons étudié les facteurs les plus importants dont dépend la réaction, il reste cependant encore quelques paramètres à envisager.

Temps de réaction

Cette étude est réalisée à partir d'une même solution de protéine et d'une même gamme de cuivre. Seuls ont différé, les temps de contact entre la solution de protéine contenant le marqueur et le cuivre non radioactif, avant la précipitation par une même quantité de $(NH_4)_2SO_4$. Ces temps ont varié de quelques minutes à 3 heures.

Des résultats obtenus, on peut tirer les conclusions suivantes :

La réaction s'équilibre très rapidement, car déjà au bout de 3 minutes, on obtient une courbe très satisfaisante. L'augmentation du temps de contact, se traduit par une augmentation du pourcentage de radioactivité liée du blanc qui passe de 72 % pour 3 minutes de temps de réaction à 87,2 % pour 3 heures. Par contre, la pente des courbes obtenues diminue . En augmentant le temps de réaction on perd donc un peu de sensibilité, sans doute à cause

d'une lente dénaturation de la protéine. Il n'est pas impossible non plus que l'existence d'au moins deux types de sites de fixation, de constantes de réaction différentes, soient en partie responsable des variations du pourcentage de radioactivité liée observées.

Dans la pratique, le temps de contact que nous avons adopté est de 15 minutes.

Température de réaction - Agitation

Au début de notre expérimentation, nous avons travaillé comme il est recommandé de le faire dans ce genre de réaction, dans la glace fondante.

Nous nous sommes rendus compte, par la suite, que le fait d'opérer à la température du laboratoire, si celle-ci n'est pas supérieure à 18° Celsius, ne modifie pas sensiblement les résultats. Cependant au-dessus de 20°, les résultats deviennent moins bons, et à partir de 37°, la réaction ne marche plus.

Dans la pratique donc, nous avons le plus souvent travaillé à la température du laboratoire.

Quant à l'agitation,elle n'a pas non plus besoin d'être continuelle, 3 minutes d'agitation réparties pendant les 15 minutes de la réaction nous paraissent suffisantes.

Volume de réaction

Ainsi que nous l'avons dit, notre réaction se fait en général dans des tubes à centrifuger, contenant 1 ml d'eau bipermutée ou d'une solution étalon de cuivre et 2 ml de solution d'apocoeruloplasmine contenant le cuivre radioactif et l'acide ascorbique, soit au total 3 ml.

Ce volume peut, sans inconvénient être réduit 3 ou 4 fois, de manière à réaliser une microméthode, sous réserve toutefois que les rapports des concentrations protéine-cuivre restent les mêmes.

D-Séparation des fractions libre et liée

Il nous reste à aborder maintenant, la phase finale de toute réaction de compétition : la séparation de l'effecteur resté libre, de celui qui est combiné avec la protéine. Cette séparation doit être bien entendu, aussi complète que possible et également rapide, de manière à ne pas déplacer l'équilibre.

Les moyens diffèrent évidemment , selon que l'on veut isoler la fraction libre ou la fraction liée.

Dès le début de ce travail, nous avons été amenés à utiliser le sulfate d'ammonium car c'est lui que SCHEINBERG et DEUTSCH utilisent pour précipiter la coeruloplasmine ou l'apocoeruloplasmine de leur solution. Cette précipitation est, d'après ces auteurs, totale pour une solution de sulfate d'ammonium à 44 %. Ce procédé permet d'isoler la fraction liée qui précipite avec la protéine et il reste en solution la fraction libre. C'est sur une partie aliquante de ce surnageant que le comptage de radioactivité est effectué.

Nous avons utilisé pour cette précipitation, une solution de sulfate d'ammonium saturée, à la température du laboratoire. Il nous a semblé que 3 ml étaient suffisants pour les 3 ml de notre volume de réaction. En-dessous, en effet, les résultats sont nettement moins bons et on a une perte importante de sensibilité. Au-dessus, par contre, il n'y a pas d'amélioration et on aboutit à une dilution plus importante de la radioactivité ce qui est gênant quand la radioactivité de départ est faible.

Cependant, ainsi que nous l'avons déjà signalé, nous avons rencontré quelques difficultés avec ce procédé pour les faibles concentrations en protéine : 0,2 et surtout 0,1 mg/ml où après une centrifugation à 4 500 tours/minute, maximum sans doute insuffisant, que nous permettait notre centrifugeuse, aucun précipité n'était visible et on obtenait alors de mauvais résultats.

Nous avons déjà dit comment nous avons tenté de résoudre ce problème, en ajoutant à la solution des γ-globulines. Il nous a donc semblé que cette technique n'était peut-être pas la meilleure mais elle nous a servi de référence.

Parmi les autres agents précipitants, nous avons essayé, le sulfate de sodium et le citrate de sodium. Ces composés ne nous ayant pas donné de meilleurs résultats, n'ont pas été retenus. L'alcool est également valable, mais il conduit à une dilution du volume de réaction trop importante. L'acide trichloracétique est à proscrire formellement dans notre cas. C'est en effet un acide fort, qui, très vraissemblablement, ionise le cuivre fixé sur la protéine, perturbant ainsi la réaction et conduisant de ce fait, à des résultats aberrants.

A l'inverse, nous avons essayé également, d'isoler la fraction libre et pour cela, nous avons utilisé les gels de dextran et les échangeurs d'ions. Parmi les gels de dextran, nous avons essayé le Séphadex type G15. A cet effet, nous avons introduit dans les tubes de dosage 1 ml d'une suspension de G15 préalablement gonflé dans l'eau. Le gel doit théoriquement retenir dans ses mailles le cuivre libre, tandis que le cuivre lié à la protéine se trouve dans le volume d'exclusion. Après centrifugation et décantation, on devrait isoler une solution correspondant à la fraction liée. Or nous devons dire que ces essais se sont toujours soldés par un échec, alors que la même expérience réalisée sur colonne nous a fourni des résultats valables. Mais sa mise en oeuvre assez longue, ne nous l'a pas fait retenir.

Une expérience du même genre, mais réalisée avec une Dowex 50 x 2, nous a donné des résultats cohérents. Si, en effet, on introduit dans les tubes de dosage, 1 ml d'une suspension de Dowex 50 x 2, on obtiendra la fixation sur la résine, du cuivre libre, la protéine et le cuivre lié, restant en solution. Les résultats obtenus, nous l'avons dit, semblent cohérents mais très différents de ceux obtenus avec la méthode au sulfate d'ammonium,pour une même dilution de protéine et une même gamme de cuivre étalon. La sensibilité, en particulier, nous semble inférieure.

En définitive, nous sommes donc revenus à la méthode au sulfate d'ammonium, qui, bien que sans doute imparfaite, est celle qui nous a donné les résultats les meilleurs et les plus reproductibles.

DISCUSSION

Nous venons d'étudier les différentes étapes qui nous ont conduit à la mise aupoint d'une méthode de dosage du cuivre, par compétition, depuis la préparation de la protéine porteuse : l'apocoeruloplasmine, jusqu'à la séparation des fractions libre et liée, en passant par l'étude des différents facteurs qui interviennent dans la réaction de compétition elle-même. Cette réaction est sensible, puisqu'elle permet de détecter le 1/1000 de µg de cuivre, et semble spécifique.

A- Calcul de la constante K

Il nous semble intéressant maintenant de calculer la constante de réaction K, de manière à comparer la valeur trouvée à celle que l'on rencontre habituellement dans les dosages par compétition. Le calcul que nous allons faire donnera une valeur approchée de K, suffisante pour avoir un ordre de grandeur.

Nous avons vu, lors de l'étude de l'influence de la concentration en protéine que :

$$R = \frac{(Q)}{(PQ)} = \frac{K}{p - (PQ)}$$

Nous avons remarqué que dans certains cas, on peut négliger (PQ) devant p, le cas le plus favorable étant évidemment celui où la concentration totale en effecteur est la plus faible, c'est-à-dire, pour le blanc, lorsque $R = Ro$.

Dans l'une de nos expériences réalisée avec une concentration en protéine de o,3 mg/ml, nous avons eu 16 400 c.p.m. pour la radioactivité du témoin, et 5 200 c.p.m. pour la radioactivité libre du blanc, ce qui donne pour le blanc un pourcentage de radioactivité liée de 68,3 % . Ceci est une valeur moyenne que nous avons fréquemment obtenue . Cela correspond à $Ro = 0,46$. La concentration réelle en protéine, dans le tube de réaction est de 0,2 mg/ml, puisqu'on introduit 2 ml de solution protéique dans un tube contenant déjà 1 ml d'eau bipermutée. En prenant 150 000 comme poids moléculaire de l'apocoeruloplasmine, la concentration moléculaire de cette protéine, est ici de :

$$\frac{0,2}{150\ 000} = 1,3 \times 10^{-6} \text{ mole/litre}$$

Donc $K = 0,46 \times 1,3 \times 10^{-6}$ mole/litre.
ou pour garder la notation que l'on rencontre dans les ouvrages traitant de ces questions .

$$K \simeq 1,6 \times 10^{6} \text{ litres/mole}$$

Cette valeur de K est nettement plus petite que les valeurs habituellement trouvées dans les réactions de compétition où $K = 10^{10}$ à 10^{12} litres/mole , et explique en partie que l'on n'ait pas une sensibilité plus élevée. Peut-être peut-on envisager de l'améliorer un peu, en cherchant en particulier un meilleur procédé de préparation de l'apocoeruloplasmine.

En effet celui que nous utilisons, nous semble assez traumatisant pour une protéine, en outre notre coeruloplasmine de départ, est lyophilisée, ce qui n'est pas idéal non plus.

B- Sensibilité

Si l'on s'intéresse maintenant à la sensibilité, théorique en utilisant les relations démontrées par EKINS et que nous avons données dans notre rappel théorique, la concentration optimum de la protéine serait :

$$p = \frac{3}{K}$$

ce qui donne ici, 0,28 mg/ml de protéine. Nous avons utilisé une concentration un peu plus faible pour atteindre le maximum expérimental de sensibilité.
Pour la concentration théorique en traceur :

$$q^{*} = \frac{4}{K}$$

ce qui donne ici 0,16 µg/ml de traceur. Nous avons utilisé une concentration nettement inférieure.
Quant à la sensibilité théorique maximum, elle est donnée par la relation :

$$\Delta q = \frac{4\sqrt{2}}{\sqrt{K\ SVT}}$$

Si l'on désire que Δq soit exprimé en µg, on devra exprimer K en ml/µg, S en c.p.m. /µg, V en ml et T en minutes ; ce qui nous donne ici :

$$K \simeq 10^{-2} \text{ ml/µg}$$

Pour S, en admettant un rendement de comptage de 20 % et une activité spécifique moyenne de 25 m Ci/mg,

$S \simeq 1100 \times 10^4$ c.p.m. / µg

V = 2 ml
T = 2 minutes.

$$\Delta q = \frac{5,68}{6,65 \times 10^2} \simeq 0,85 \times 10^{-2} \text{ µg},$$

soit un peu mieux que le 1/100 de µg.

En pratique, pour cette concentration en protéine de 0,3 mg/ml, nous avons une sensibilité un peu moins bonne. Ceci est normal, puisque cette relation, rappelons-le, ne suppose comme seules causes d'erreurs expérimentales que celles inhérentes au comptage de radioactivité. Il y a cependant une assez bonne concordance entre les résultats expérimentaux et les prévisions théoriques sauf en ce qui concerne la concentration en traceur, mais EKINS (40) signale ce fait comme étant normal, si l'on ne tient compte que des erreurs de comptage.

C- Reproductibilité et Précision

Il nous parait indispensable de donner quelques indications sur la reproductibilité et la précision que l'on peut atteindre sur les courbes standards. Il est malheureusement difficile de comparer entre eux, les résultats obtenus sur des lots d'apocoeruloplasmine différents. En effet on assiste dans des conditions opératoires identiques, à des variations sensibles des pourcentages de radioactivité liée correspondant à une même quantité de cuivre, et moins nettement des pentes des courbes obtenues elles-mêmes. Ceci est dû au fait que des apocoeruloplasmines préparées apparemment de manière identique, possèdent pratiquement des réactivités différentes. L'idéal serait évidemment de préparer cette protéine en grande quantité et de pouvoir ensuite la conserver sous forme

lyophilisée. Il est probable alors que l'on aurait pour des conditions opératoires semblables des résultats voisins et comparables. On est donc amené pour faire cette étude à ne travailler que sur des mêmes lots d'apocoeruloplasmine. Le plus simple est alors de recommencer plusieurs fois la réaction et de comparer les résultats et les courbes obtenues qui doivent être évidemment aussi identiques que possible.

Cela pose d'emblée le problème de la représentation de la courbe standard. Nous avons vu en effet, lors du rappel théorique, que l'on peut représenter les résultats en portant soit les variations de R en fonction de la quantité d'effecteur, soit celles de 1/R en fonction toujours de la quantité d'effecteur.

C'est la première solution que nous avons choisie, qui conduit , nous l'avons vu, à un segment de droite, si l'on ne dépasse pas une certaine concentration. Avec cette représentation, en effet, l'influence des différents paramètres de la réaction, ressort, plus nettement, que dans l'autre qui est un arc d'hyperbole. Cependant, elle présente, par ailleurs, certains inconvénients. On peut en effet, être tenté de faire un nombre insuffisant de déterminations ce qui nuira évidemment à la précision. En outre, ce mode de représentation ne fait pas apparaître la limite, au delà de laquelle la réaction, perdant beaucoup de la sensibilité, ne conduit pas à des résultats valables.

La seconde représentation est plus délicate, et pour être précise, nécessite plus de points mais elle rend bien compte des limites du dosage, car il est bien clair que dans la région où la courbe tend à devenir asympote à l'axe des abscisses, aucun dosage précis n'est possible. C'est pourquoi, dans la pratique de routine, nous pensons que la représentation hyperbolique est plus fiable.

Il est d'ailleurs bon, si l'on veut une bonne précision, de réaliser la gamme en double au moins et les dosages aussi. Sur le plan pratique, on peut dire que les erreurs commises sur les dosages ont, en première approximation, deux origines :
- erreurs dues au comptage de la radioactivité,
- erreurs, venant de la manipulation proprement dite(erreurs de pesées, erreurs de pipetage, réactifs ou tubes souillés..)

Les premières peuvent évidemment être réduites en comptant davantage de coups : soit en augmentant le volume compté, mais on est limité, soit en augmentant le temps de comptage, mais comme ce temps de comptage doit être le même pour tous les tubes (comptage en pré-temps), la précision ne sera pas la même pour tous les points, car la radioactivité varie au cours du dosage. Il serait souhaitable de travailler en pré-compte, ce qui donne évidemment la même précision pour tous les comptages, mais nous n'avons pu le faire, l'appareillage dont nous disposons, ne nous le permettant pas. Quant aux erreurs de manipulation, on les réduira par le choix d'un matériel approprié (pipettes notamment) et en multipliant les mesures ainsi que nous venons de le voir. Nous avons obtenu un coefficient de variation de l'ordre de 5 %. Il nous est même souvent arrivé de faire beaucoup mieux. C'est ainsi que dans une de nos expériences, où la concentration en apocoeruloplasmine était de 0,3 mg/ml, la gamme de cuivre allait de 0,1 à 1 µg/ml, où la réaction a été faite en double et où les dosages correspondants aux concentrations de 0,1 et 1 µg de cuivre/ml ont été refaits 10 fois chacun, nous avons obtenu les résultats suivants (tableau XIV) (c'est la moyenne des chiffres obtenus que nous donnons).

TABLEAU XIV

Etude de la précision

Concentration de la gamme de cuivre en g/ml	*Témoin 0*	*0*	*0,1*	*0,3*	*0,5*	*0,7*	*1*
Radioactivité de 2 ml de surnageant en c.p.m.	7295	1265	2140	2925	3755	4150	47
$\frac{\%\ \text{Radioact. libre}}{\%\ \text{Radioact. liée}}$		0,21	0,41	0,66	1,06	1,31	1,

Voici par ailleurs les diverses valeurs de

$$R = \frac{\text{\% Radioactivité libre}}{\text{\% Radioactivité liée}}$$ correspondant aux 10 mesures des tubes contenant 0,1 µg/ml et 1 µg/ml de cuivre.

$R_{0,1}$	0,42	0,38	0,43	0,39	0,40	0,40	0,42	0,41	0,38	0,40
R_1	1,75	1,86	1,89	1,72	1,84	1,70	1,80	1,79	2,05	1,82

Pour interpréter ces résultats, qui, nous le voyons, sont homogènes nous avons pensé à établir une corrélation entre les différentes valeurs de la concentration en cuivre que nous appellerons ici x et les valeurs correspondantes que prend le rapport R, que nous appelerons ici y. Les calculs effectués sur Olivetti programma 101 conduisent aux résultats suivants :

moyenne des x : $\bar{x} = 0,4333$
moyenne des y : $\bar{y} = 0,91166$
variance de x : $\sigma x^2 = 0,11889$
écart-type de x : $\sigma x = 0,34480$
variance de y : $\sigma y^2 = 0,30219$
écart-type de y : $\sigma y = 0,54971$

Les coefficients des droites de régression sont

$$a = 1,59\ 204$$
$$b = 0,22\ 178$$

et

$$a' = 3,75\ 812$$
$$b' = -2,99281$$

Le coefficient de corrélation : $r = 0,99\ 872$.

La valeur du coefficient de corrélation montre la grande précision que l'onpeut atteindre dans certains cas favorables.

APPLICATION AU DOSAGE DU CUIVRE SERIQUE

A- *Séparation du cuivre ionisé des protéines du milieu*

Le mode de prélèvement et le procédé d'ionisation du cuivre sont les mêmes que ceux déjà décrits dans la première partie de notre travail.

Un problème se pose alors : celui de séparer le plus complètement possible le cuivre ionisé des protéines du milieu. En effet, nous avons vu que l'albumine et les β-globulines peuvent fixer le cuivre et perturber ainsi le dosage.

Il est possible d'aborder le problème de 2 manières :
- soit réaliser une minéralisation du milieu,
- soit réaliser une séparation aussi quantitative que possible en utilisant des méthodes classiques comme l'extraction du cuivre par un réactif spécifique, l'ultrafiltration sur membrane, la chromatographie sur gel ou sur échangeur d'ions, la précipitation des protéines.

Nous avons expérimenté ces différentes techniques :

1) Minéralisation du milieu par la technique de destruction nitrosulfurique.

Ce procédé présente l'intérêt de permettre un dosage du cuivre non seulement dans le sérum mais dans n'importe quel tissu. Il présente cependant un certain nombre d'inconvénients. Il faut en effet posséder l'appareillage approprié : notamment Kjeldahl en quartz et réfrigérant à reflux, bec Mecker, hotte, réactifs chimiques très purs en particulier HNO_3 et H_2SO_4. De plus, le liquide de destruction obtenu est très fortement acide et doit être ramené à un pH convenable pour la réaction ce qui conduit à une solution de concentration saline élevée, que l'on doit diluer.

Nous devons dire, que nous n'avons pas eu de bons résultats pour les dosages effectués sur des sérums, à partir de ce procédé . Il est vrai que notre expérimentation a été assez réduite, car cette technique nous a paru trop complexe pour un simple dosage de cuivre dans le sérum.

2) Extraction du cuivre sous forme de complexe

Nous avons expérimenté uniquement sur le dithizonate.

Il faut dans un premier temps, extraire le dithizonate formé qui est en phase chloroformique, puis dans un deuxième temps, refaire passer le cuivre en milieu aqueux en détruisant le dithizonate par acidification. Mais les résultats obtenus sur des dosages de cuivre sérique ont été ici aussi, mauvais, c'est pourquoi nous avons abandonné également ce procédé.

3) Ultrafiltration sur membranes

L'ultrafiltration sur membranes ultrafiltrantes du type millipore ne nous a pas paru non plus être une bonne méthode. En effet, la membrane qui semblerait la meilleure pour séparer le cuivre des protéines est la membrane PSAC qui a un pouvoir d'arrêt de 1000. Malheureusement cette membrane retient 48 à 50 % du cuivre, ainsi que nous avons pu le vérifier, ce qui est évidemment très gênant. De plus cette technique est longue, nécessite de l'azote sous pression, et est assez onéreuse.

4) Séparation sur résine échangeuse d'ions

La séparation du cuivre et de la protéine sur une résine échangeuse de cations, du type Dowex 50, n'est pas excellente, car si la résine retient bien le cuivre, elle retient aussi en partie la protéine ainsi que nous l'avons déjà vu, d'ailleurs, lors de la préparation de l'apocoeruloplasmine selon la méthode de SCHEINBERG et MORELL . On décroche le cuivre fixé soit par formation de complexe avec des ions aminoacétate ou éthylène diamine tétracétate, complexes qu'il faudra ensuite détruire, soit par action des ions Na^+ ou NH_4^+ à forte concentration. Dans tous les cas on a une dilution assez importante et la solution n'est pas exempte de protéines.

5) Séparation sur Séphadex

La méthode consistant à réaliser cette séparation en utilisant un séphadex G15 ou un biogel P10, donne de meilleurs résultats. Nous utilisons un gel de séphadex G_{15} gonflé dans le tampon acétate PH 3,6 déjà cité. Une colonne de 1,5 cm x 20 cm est réalisée. Elle reçoit 1 ml de sérum additionné de 0,5 ml de HCl 0,2 N. L'élution est faite par le tampon. Le débit est de 15 gouttes par minute. Un collecteur de fractions permet de séparer des fractions de 2 ml. Dans ces conditions, le cuivre passe entre le 3è et le 7è tubes avec une proportion de 78 à 80 % dans le 4è tube. Les protéines commencent à apparaître dès le 6è tube. C'est sur 1 ml de l'éluat correspondant au 4è tube que le dosage sera effectué. Compte tenu du protocole opératoire, le résultat trouvé doit être multiplié par un coefficient 3,8. La gamme étalon doit être réalisée avec une solution d'apocoeruloplasmine à 0,3 mg/ml faite dans le même tampon. En opérant toujours dans les mêmes conditions, la reproductibilité est bonne. Nous avons pu le vérifier en répétant les dosages sur un même sérum d'une part et sur des sérums supplémentés d'une quantité connue de cuivre d'autre part. Le coefficient de variation est de 6 % .

Le seul inconvénient de cette technique est de nécessiter un collecteur de fractions. Il est cependant possible d'opérer le fractionnement à la main, compte-tenu de la reproductibilité de la filtration sur gel.

6) Précipitation des protéines

La dernière méthode que nous avons utilisée consiste à précipiter les protéines par de l'acide trichloracétique ainsi que cela a été déjà décrit pour la méthode de dosage du cuivre sérique par dilution radioisotopique.

Après centrifugation, le surnageant qui contient le cuivre ionisé, contient aussi un excès d'acide trichloracétique, qu'il faut éliminer le mieux possible. Pour cette élimination nous avons utilisé l'extraction par l'éther. Pour 5 ml de défécat, nous faisons trois extractions successives par 20 ml d'éther. Puis l'excès d'éther est chassé par évaporation au bain-marie bouillant. La solution

est ensuite neutralisée par de la soude 2N de manière à ne pas réaliser une trop grande dilution. L'ensemble de ces opérations s'accompagne d'une diminution du volume initial (sérum + HCl 0,2 N+ acide trichloracétique à 20 %) de 31 % . De plus l'extraction par l'éther, enlève 8 à 9 % du cuivre, ainsi que nous avons pu le constater en ajoutant à notre défécat du cuivre 64. C'est pourquoi, il faudra multiplier le résultat final de la concentration, correspondant à 1 ml de cette solution par un facteur 2,27 pour avoir la concentration en cuivre de 1 ml de sérum. La gamme étalon est réalisée ici encore à partir d'une solution d'apocoeruloplasmine à 0,3 mg/ml et doit contenir du NaCl à la concentration de 9‰, de manière à tenir compte du fait que le milieu réactionnel renferme du NaCl à une concentration de cet ordre.

Les résultats, nous devons le dire, sont moins bons que les précédents. Le coefficient de variation est voisin de 8 % et nous avons parfois eu des résultats aberrants. Il est probable que l'extraction de l'acide trichloracétique est insuffisante dans certains cas.

En conclusion, nous dirons que nous ne pensons pas avoir trouvé de solution vraiment idéale en ce qui concerne la séparation cuivre-protéine. Cependant les deux dernières méthodes fournissent des possibilités de dosage dont la précision est suffisante en biologie.

A titre indicatif, voici les résultats obtenus pour des dosages decuivre sur 8 sérums pris auhasard par la méthode de compétition d'une part et l'absorption atomique d'autre part (tableau XV). Pour la méthode de compétition, nous donnons les résultats obtenus avec nos 2 techniques de séparation (Séphadex G15 et acide trichlora cétique). Les chiffres donnés représentent la moyenne de 2 mesures. Ils sont exprimés en µg de cuivre pour 100 ml de sérum.

TABLEAU XV

Dosages de cuivre sérique.
Comparaison entre la méthode par compétition et l'absorption atomique.

N° des échantillons de sérum	*Méthode par compétition Séphadex G15*	*Méthode par compétition acide trichloracétique*	*Absorption atomique.*
1	117	124	119
2	95	99	94
3	91	93	89
4	120	125	117
5	104	106	106
6	115	120	111
7	94	93	90
8	116	119	110

Ainsi qu'on peut le voir, la concordance est assez bonne. La méthode par compétition, donne, dans l'ensemble, des chiffres plus élevés que l'absorption atomique, les plus élevés étant ceux correspondant au traitement par l'acide trichloracétique .

B) Conclusions

Nous pensons avoir mis au point une technique originale et valable de dosage du cuivre applicable aux milieux biologiques. Cette technique est basée sur une réaction de compétition entre le cuivre et l'apocoeruloplasmine utilisée comme protéine porteuse, en présence de Cu64.

La réaction semble spécifique, reproductible et sensible, puisque l'on peut atteindrele 1/1000 de µg de cuivre dans la prise d'essai ce qui peut rivaliser avec l'absorption atomique et est supérieur à ce que donne n'importe quelle réaction colorimétrique.

L'étude des différents facteurs dont dépend la réaction, en particulier l'action du pH, soulève des problèmes qui mériteraient peut-être d'être étudiés de plus près.

De plus, la méthode peut sans doute être encore améliorée. La préparation de l'apocoeruloplasmine telle que nous la réalisons, ne nous semble pas idéale car nous n'avons pas réussi à standardiser la réactivité de notre protéine. Dans des conditions identiques de préparation et de réaction, en effet, le pourcentage de radioactivité liée du blanc peut varier de 50 à 80 % pour différents lots d'apocoeruloplasmine. Il est certain que la préparation en assez grande quantité d'apocoeruloplasmine sous forme lyophilisée comme l'a fait BROMAN (17), selon la 2è méthode de SCHEINBERG, donnerait des courbes plus homogènes et permettrait de plus un emploi immédiat. Il ne serait pas impossible dans ces conditions, d'imaginer la réalisation d'un "kit" de dosage du cuivre sérique comprenant une apocoeruloplssmine lyophilisée et du Cu67 comme traceur, de période nettement plus longue que celle de Cu64. De même la séparation cuivre-protéine pour le dosage dans le sérum ne nous satisfait pas complètement.

C O N C L U S I O N

Il a été mis au point deux méthodes de dosage du cuivre applicables aux milieux biologiques et nécessitant l'emploi du radiocuivre 64.

La première méthode décrite utilise la dilution radioisotopique avec extraction incomplète. Le cuivre est extrait sous forme de dithizonate au pH spécifique de 2,3. La réaction est sensible et spécifique.

La seconde méthode employée met en oeuvre une réaction de compétition avec comme protéine porteuse une apocoeruloplasmine préparée par action de KCN sur la coeruloplasmine. Cette réaction est environ vingt fois plus sensible que la précédente, tout en étant aussi spécifique.

Ces deux méthodes semblent être parfaitement valables et seules la radioactivation ou l'absorption atomique avec un appareillage très performant peuvent les surpasser.

B I B L I O G R A P H I E

1 - AROTTA (U) et coll.
Minerva ginecol. 1970, 22, 597-602.

2 - AXTRUP (S.)
A - B. PH. Linds tedts Univ. Bokhandel ; Hakan Ohlssons Bokmyckeri, Lund 1946, 146 pp.

3 - BACKER (E.T.)
Clin. Chim. Acta 1969, 24, N°2, 233-238

4 - BATTISTONE (G.C.) et Coll.
Clin.Chim. Acta 1970, 30, 429-438

5 - BEARN (A.G.), KUNKELH (G.)
Proc.Soc. exper. Biol. Med. U.S.A. 1954,85,N°1 44-48.

6 - BERGE (D.G.)
Amer. J. Med. Tech. 1968, 34, 725-730

7- BERSON (S.A.) et YALOW (R.S.)
Clin. Chim. Acta. 1968,22, 51.

8 - BERTRAND (D.)
Cahiers techniques du C.N.R.S. 1962 - p. 31.

9 - BINNERTS (W.T.) et BOOM (W.G.)
Symposium on "invitro" procedures with radioisotopes in Clinical medicini and research . Vienna, 8,12 septembre 1969.

10 - BIZOLLON (Ch. A.)
Ann. Pharm. Franc. 1965,23, n°s 7 - 8, 461-472.

11 - BOHUON (C.)
Ann. Biol. Clin., 1958, 16, n°s 1-2, 73-77.

12 - BOJOVIC (V.) et coll.
Med. Lavoro. 1968, 59, 357-360.

13 - BOLOMEY (R.A.)
U.S. Atomic Energy commission Repore AECD, 1949, 2665.

14 - BORGLIN (N.E.) et coll.
Acta. Obstet. Gynec. Scand. 1967, 46, 119-125.

15 - BORISOVA (M.A.)
Vrach Delo 1966, 8, 96-97.

16 - BOWEN (H.J.M.)
Intern. J. Appl. Radiation and Isotopes, 1959, 4, 214-220.

17 - BROMAN (L.) et KJELLIN (K.)
Biochim. Biophys. Acta, 1964,82, 101.

18 - BRÜCKMANN (G.) et ZONDEK (S.G.)
Biochem. J. 1939, 33, 1845-1857.

19 - BURROWS (S.) et coll.
Am. J. Obstet. Gynec. 1971, 109, 907-909.

20 - CALME (P.) et coll.
Mikrochim . Acta. 1969, 6, 1276-1284 .

21 - CARTWRIGHT (G.E.)
Blood, 1947, 2, 111-153 et 256-298.

22 - CARTWRIGHT (G.E.)
"Copper Metabolism" Mc ELROY et GLASS,
John Hopkins, Baltimore (1950).

23 - CASTELLO (D.) et coll.
Minerva Pediat. 1967, 19, 1202-1209.

24 - CASTREN (J.A.) et coll.
Acta Ophtal. (Kobenhavn), 1968, 46, 785-791.

25 - CHASE (M.S.), GUBLER (C.J.) CARTWRIGHT (G.E.) et WINTROBE (M.M.)
J. Biol. Chem. 1952, 199, 757-763.

26 - CHITRE (V.S.) et coll.
Indian J.Med 1970, 58, 563-573.

27 - CHOU (T.P.) et ADOLPH (W.H.)
Biochem. J. 1935, 29, 476-479.

28 - COHN (E.J.)
Blood, 1948, 3, 471-485.

29 - COMAR (D.), LE POEC (C.), JOLY (M.) et KELLERSHON (S.)
Bull. Soc. Chim. France, 1962, 56.

30 - CUMINGS (J.N.)
Brain, 1948, 3,471-485.

31 - CUNNINGHAM (I.J.)
In "Copper metabolism" (N.D. Mc ELROY and B. GLASS eds) Johns Hopkins Baltimore 1950.

32 - DAVISON (A.J.) et coll.
Arch. Biochem. 1968, 126, 228-231.

33 - DAWSON (J.B.) et coll.
Clin. Chimi. Acta. 1968, 21, 33-42.

34 - DEUTSCH (H.F.)
Arch. Biochem. Biophys. 1960, 89, 225.

35 - DEVOTO (G.)
Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 1968, 44, 1249-1251.

36 - DICK (A.T.)
Doctoral Thesis , University of Melbourne, Australia 1954.

37 - DOWDY (R.P.)
Amer.J. Clin. Nutr. 1969, 22, 887-892.

38 - EARL (C.J.), MOULTON (M.J.), SELVERSTONE (B.)
Am. J. Med. 1954, 17, n° 2, 205-213.

39 - EKINS (R.P.)
Clin. Chim. Acta. 1960, 5,453.

40 - EKINS (R.P.) NEWMAN (G.B.) et O'RIORDAN (J.L.H.)
Radioisotopes in Medicine "in vitro" studies,
R.L. HAYES, F.A. GOSWITZ et B.E.P. MURPHY Eds,
U.S.A.E.C., OAK RIDGE Tenessee, 1968, 59.

41 - ELVEHJEM (C.A.)
Physiol. Rev. 1935, 15, 471-507.

42 - FELDAM (F.J.), KELLEY (T.F.), BLASI (J.A.)
Clin. Chem. 1969, 15, n°8, 789.

43 - FELL (G.S.) et coll.
J. Clin. Path. 1968, 21, 8 - 11.

44 - FISCHER (P.) et coll.
Z. ges. Inn. Med. 1968, 23, 659-662.

45 - FLEURY (P.) et COURTOIS (J.B.)
Ann. Pharm. Fr. 1945, 3, p. 14.

46 - FRANGINI (V.) et coll.
Riv. Clin. Pediat. 1968, 81, 732-741.

47 - FRIEDMAN (S.) et coll.
Obstet. Gynec. 1969, 33, 189-194.

48 - FRITZSCHE (H.)
Biochim. Biophys. Acta, 1970, 224, 608-609.

49 - FUJII (Y)
J. Jap. Soc. Intern. Med. 1969, 58, 303-311.

50 - FURNAMENKO (N.F.)
Klin. Khir. 1969, 10, 48-51.

51 - GAILLOT (J.) et coll.
Ann. Biol. Clin. 1967, 25, 1037-1052.

52 - GIRARD (M.L.) et ROUSSELET (F.)
Ann. Pharm. Franc. 1967, 25, n° 5, 353-360.

53 - GLAZEBROOK (A.J.)
Edimburgh M.J. 1945, 52, 83.

54 - GOLFISCHER (S.) et coll.
Amer. J. Path. 1968, 53, 883-901.

55 - GREEN (I.)
J. Dent. 1970, 49, 776-782.

56 - GUALANDRI (V.) et coll.
Acta Genet. Med. gemellol. 1970, 19, 107-110.

57 - GUILLEMANT (S.), THOUMOPOULOS (P.) et DESGREZ
Xè Réunion des Endocrinologistes de langue Française, MASSON, DOIN Eds, Paris 1969, p. 139.

58 - HALSTED (J.A.) et coll.
Amer. J. Obstet. Gynec. 1969, 105, 645-646.

59 - HANIG (R.C.), APRISON (M.H.)
Analyt. Biochem. 1967, 21, n° 2, 169-177.

60 - HARALCAMBIE (G.) et coll.
Aerztl. Forsch. 1970, 24, 112-115.

61 - HAUROWITZ (F.)
Ztschr. Fur Physiol. Chem. 1930, 190, 72.

62 - HEILMEYER (L.), KEIDERLING (W.) et STUWE (G.)
Kupfer und Eisen als korper elgene Wirkstoffe und ihre Bedeuntung beim Krankheitsgeschelen. 1941; 132 pp. Fischer, Jena.

63 - HERMANN (R.)
Z. Ges. Exper. Med. Dtsch. 1955, 126, 334-337.

64 - HOLMBERG (C.G.)
Acta Chem. Scand . 1947, 1, 744-950.

65 - HOLMBERG (C.G.) et LAURELL (C.B.)
Acta Chem. Scand. 1948, 2, 550-556.

66 - HRGOVCIC (M.) et coll.
Cancer, 1968, 21, 743-755.

67 - HUBBARD (D.M.) et SPETTEL (E.C.)
Anal. Chem., 153, 25, 1245-1247.

68 - HUNT (C.E.) et coll.
Br. J, Nutr. 1970, 24, 607-614.

69 - HUTCHINSON (J.H.)
Quart. J. Med. (N.S.) 1938, 7, 397.

70- IANCHUR (N.M.) et coll.
Klin. Khir. 1967, 4, 27-30.

71 - ICHIDA (T.) et coll.
Clin. Chim. Acta, 1969, 24, 299-303.

72 - IIDA (C.) et coll.
Anal. Biochem. 1967, 21, 1-21.

73 - JAMES (B.E.) et coll.
Med. J. Aust 1970, 2, 1161-1163.

74 - KALNAI (E.H.) et coll.
Beitr. Klin. Erforsh Tubek, 1968, 137, 19-29.

75 - KASPER (C.B.) et DEUTSCH (H.F.)
J. Biol. Chem. 1965, 238, 2325.

76 - KESTON (A.S.)
Symposium on "in vitro" procedures with radio-isotopes in clinical medicine and research. Vienna 8-12 sept. 1969.

77 - KITAGUCHI (K.) et coll.
Jap. J. Clin. Path. 1969, 17, 495-499.

78 - KOMLEV (A.I.) et coll.
Lab. Delo. 1970, 2, 93-97.

79 - KOT (E.) et coll.
Pol. Tyg. Lek. 1967, 22, 1067-1068.

80 - LACHIVER (F.) et LELOUP
Technique de chimie biologique, Masson et Cie, Edit. Paris, 1954.

81 - LAHEY (M.E.), GUBLER (C.J.), CHASE (M.S.), CARTWRIGHT (G.E.) et WINTROBE (M.M.)
Blood 1952, 7, 1053.

82 - LECUREUIL (M.)
Thèse doctorat en pharmacie (Etat) Tours 1971.

83 - LEVERTON (R.M.) et BINKLEY (E.S.)
J. Nutrition 1944, 27, 43-53.

84 - LINDOW (C.W.), ELVEHJEM (C.A.) et PETERSON (W.H.)
J. Biol. Chem. 1929, 82, 465-471.

85 - Mc CALL (J.T.), DAVIS (G.K.) et STEARNS (T.W.)
Anal. Chem, 1958, 30, 1345-1347.

86 - MAGDOFF - FAVICHILD (B.) et coll.
J. Biol. Chem, 1969, 244, 3497-3499.

87 - MAGID (E.)
Scand. J. Haemat. 1967, 4, 257-270.

88 - MALKIN (R.) et coll.
Europ. J. Biochem. 1969, 7, 253-259.

89 - MALLORY (F.B.) et PARKER (F.)
Amer. J. Path. 1931, 7, 365-371.

90 - MANN (T.) et KEILLIN (D.)
Proc. Roy. Soc. Lond. B. 1938, 126 303-315.

91 - MARECEK (Z.) et coll.
Cas. Lek Cesk. 1969, 108, 121-123.

92 - MARRIOTT (J.) et coll.
Biochim. Biophys. Acta 1968, 154, 501-506.

93 - MARSTON (H.B.)
Physiol. Rev. 1952, 32, 66

94 - MATOUSEK (J.P.) et coll.
Clin. Chem. 1971, 17, 363-368.

95 - MATTHEWES (W.B.)
J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr. G.B. 1954, 17, n° 4, 242-246.

96 - MELEKIN (V.D.)
Pat. Fiziol. Eksp. Ter. 1970, 14, 59-63.

97 - MERET (S.) et coll.
Clin. Chem. 1971, 17, 369-373.

98 - MILLS (C.E.)
Biochem. J. 1954, 57, 603.

99 - MITCHELL (H.H.) et HAMILTON (T.S.)
J. Biol. Chem. 1949, 178, 345-361.

100- MOLLMANN (H.) et coll.
Z. Klin. Chem. 1969, 7, 647.

101- MORELL (A.G.) et SCHEINBERG (I.H.)
Science 1958, 127, 588.

102- NASSI (I.) et coll.
Riv. Clin. Pediat. 1967, 80, 157-172

103- OGATA (Y.) et coll.
Tetrahedron, 1970, 26, 4711-4716.

104- OKINAKA (S.), YOSHIKAWA (M.), MOZAI (T.) et TOYOTA (M.)
Tohoku J. Exper. Med., 1953, 57, 349-358.

105- OKUDA (M.) et coll.
Jap. J. Clin. Path. 1970, 17, 84.
Saiskin Igaky, 1970, 25, 1812-1817 et 1966-1970.

106- O'LEARY (J.A.), SPELLACY (W.N.)
Am. J. Obstet. Gynecol. 1969, 103, n°1, 131-132.

107 - ORR (C.W.)
Biochemistry 1967, 6, 2995-2996.

108 - OSBORN (S.B.) et coll.
Lancet 1969, 2, 17-20.

109 - PARKER (M.M.), HUMOLLER (F.L.) , MAHLER (D.J.)
Clin. Chem. 1967, 13, n° 1, 40-48.

110 - PIJCK (J.), GILLIS (J.), et HOSTE (J.)
Int. J. of applic. Rad. Isot. 1963.

111 - POGGINI (G.) et coll.
Riv. Clin. Pediat. 1968, 81, 597-604.

112 - POLONOVSKI (M.) et BRISKAS (S.)
C.R. Soc. Biol. 1938, 129, 379.

113 - PORTER (J.A.)
"Principles of Chemistry" A.S. Barnes et Co,
New-York et Chicago 1875.

114 - POULIK (M.D.)
Ann. Acad. Sci. 1968, 151, 476-501.

115 - PRIEV (I.G.)
Vop. Pitan. 1966, 25, 61-63.

116 - RICE (E.)
J. Lab. Clin. Invest., 1960, 55, 325.

117 - ROACH (A.), SANDERSON (P.) et WILLIAMS (D.R.)
Analyst, 1968, 93, 42-49.

118 - RODBARD (D.), RAYFORD (P.L.), COOPER (J.A.), ROSS
(G.T.) J.Clin. Endocr. 1968, 28, 1412.

119 - RUZIKCA (J.) et STARY (J.)
Talanta, 1962, 9, 617-621.

120 - SACHS (A.), LEVINE (V.E.), HILL (F.C.) et HUGUES
(R.C.) Arch. Internat. Med. 1943, 71, 489.

121 - SAKAI (A.)
Jap. J. Hyg. 1970, 25, 420-437.

122 - SANDBERG (M.), GROSS (H.) et HOLLY (O.M.)
Arch. Path. 1942, 33, 834-844.

123 - SAVAGONE (E.)
Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 1953, 29, n° 4, 670-672.

124 - SCATCHARD (G.)
Ann. N.Y. Acad. Sci., 1949, 51, 660

125 - SCHEINBERG (I.H.) et MORELL (A.G.)
J. Clin. Invest. 1957, 36, 1193

126 - SCHEINBERG (I.H.) , AISEN (P.) et MORELL (A.G.)
Vox sanguinis 1959, 4, 69

127 - SCHENKER (J.H.) et coll.
Obstet. Gynecol. 1971, 37, 233-237.

128 - SCHUBERT (G.) et RIEZLER (W.)
Klin. Wochenschr. 1947, 24, 304-306.

129 - SHOKEIN (M.H.) et coll.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 1969, 62, 867-872.

130 - SIMONS (K.) et coll.
Biochim. Biophys. Acta. 1969, 175, 260-270.

131 - SMALL WOOD (R.A.) et coll.
Lancet, 1968, 2, 1310-1313.

132 - SPECTOR (H.) et coll.
Clin. Chim. Acta, 1971, 31, 5-11.

133 - STROMBERG (A.G.) et coll.
Lab. Delo, 1969, 4, 235-237.

134 - THOMPSON (R.H.S.) et WATSON (D.)
J. Clin. Path. 1949, 2, 193-196.

135 - TODD (A.P.) et coll.
J. Clin. Path. 1967, 20, 276-279.

136 - TORALBALLA (G.C.) et coll.
Mikrochim. Acta, 1970, 5, 879-883.

137 - TRUHAUT (R.), BOUDENE (C.) PHU-LICH (N.)
Ann. Biol. Clin. 1964, 22, n°s 7-9, 901-907.

138 - TURPIN (R.) et coll.
Semaine des Hôp. Paris, 1953, 29, 2297-2308.

139 - UZNAN et coll.
Am. J. Med. Sci. Philadelphie 1956, 231-235.

140 - VAN RAVESTEYN (A.H.)
Acta med. Scand. 1944, 118, 163-196.

141 - VASILETS (I.M.) et coll.
Biokhimiia 1968, 33, 1285-1295.

142 - VRIGNAUD (C.), DUCASSOU (D?), VRIGNAUD (N.) et BLANQUET (P.)
Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 1969,108, 169-176.

143 - WALDMANN (T.A.), MORELL (A.G.), WOCHNER (R.D.), STROBER (W.) et STERNLIEB (I)
J. Clin. Invest., 1967, 46, 10-20.

144 - WALSHE (J.M.)
Clin. Sci. 1963, 25, 405.

145 - WEBER (P.M.) et coll
J. Nucl. Med. 1969, 10, 591-596.

146 - WELCHER (F.J.)
D. Van Norstrand Co. Inc. New-York 1947, I, II, III, et IV.

147 - WILLIAMS (R.J.P.)
J. Chem. Soc. 1953, 3192.

148 - WORWOOD (M.) et coll.
Int. J. Appl. Radiat. 1968, 19, 753-756.

149 - YALOW (R.S.) et BERSON (S.A.)
J. Clin. Inv. 1960, 39, 1157.

Editions BERGERET 71/73, rue Leyteire - 33000 - BORDEAUX.
Tél. (56) 91.12.59.

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté :

RADIOISOTOPES ET TOXICOLOGIE

Vu,
Le Président de
L'UNIVERSITE DE BORDEAUX II
H. BRICAUD

Bon à imprimer
Le Président de Thèse :
P. BLANQUET

Vu et permis d'imprimer
Bordeaux, le 14 mai 1974
Le Chancelier des Universités :
R. PAULIAN